



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

RAFAEL DE LIZ

Estudo do efeito antiinflamatório da *Solidago chilensis* Meyen em modelo de inflamação induzida pela carragenina, em camundongos

Florianópolis

2007



Universidade Federal de Santa Catarina

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

RAFAEL DE LIZ

Estudo do efeito antiinflamatório da *Solidago chilensis* Meyen em modelo de inflamação induzida pela carragenina, em camundongos

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Farmácia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmácia, sob a orientação da Profa. Dra. Tânia Silvia Fröde.

Florianópolis

2007

"A minha preocupação não está em ser coerente com as minhas afirmações anteriores sobre determinado problema, mas em ser coerente com a verdade. O ERRO não se torna verdade por se difundir e multiplicar facilmente. Do mesmo modo, a VERDADE não se torna erro pelo fato de ninguém a ver."

Mahatma Gandhi

A Deus, por me proporcionar um momento tão especial, em um caminho de vitórias, derrotas e muitos aprendizados.

A meus pais, por todo amor, todo apoio, todo o esforço e toda a confiança depositada.

À professora Dra. Tânia Silvia Fröde, por sua dedicação, carinho, atenção e incentivo.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus por ter me proporcionado este momento único e de tantas lembranças marcantes. Pela chance de ter concluído este curso mediante dificuldades, mas também muitas conquistas e um enorme aprendizado.

Gostaria de agradecer também a meus pais Moacir e Nilva, pelo infinito apoio nos momentos difíceis e pela imensa confiança depositada. Pela conversa, pelos conselhos e, acima de tudo, por sempre terem investido em minha educação. Pai, mãe, fico eternamente grato por tudo que fizeram por mim.

À minha irmã Fabiana, por toda a amizade que cultivamos nesses anos morando juntos e por tudo que aprendi com ela, por me ajudar quando mais precisei e por me ouvir quando eu não tinha para quem falar.

À Silvana Vigil, que desde o começo me apoiou, em todos os sentidos, foi uma pessoa sincera, companheira e esteve perto de mim nos momentos fáceis, mas também nos difíceis. Por ter sido uma pessoa fundamental nesta fase da minha vida.

Aos colegas do laboratório, com quem tive a oportunidade de conviver, Stella, Silvana Zucolloto, Jucélia, Vanessa, Ziliani, Janaína, Eduardo, Diana, Gustavo, Giliard, Aerton, Róbson e Ana Beatriz, pelos experimentos, pelos congressos, e principalmente, pelo companheirismo e pela amizade que criei com cada um de vocês e que vou levar para sempre comigo.

Aos meus amigos de Florianópolis: Jessé, Gabriel, Rodrigo, Anderson, Hélio, Charles e aos meus amigos de Lages: Juliano, Jonathan, Diego, Dennis, André, Vinicius, Patrick, Michel, Carlos, Leandro, Róbson, Jean, Róger, Gabriel, Jéferson, por toda a descontração, e por estarem do meu lado quando mais precisei.

À professora Dra. Tânia Silvia Fröde, por todo incentivo, por ter acreditado em mim e, acima de tudo, pelo convívio saudável que tivemos e pelo imenso conhecimento que me foi passado.

Ao professor Dr. Eloir Paulo Schenkel e à Maria Izabel Goularte Moritz, pela produção dos extratos estudados e pelo trabalho em equipe.

SUMÁRIO

	Pag.
LISTA DE ABREVIACÕES	7
LISTA DE FIGURAS	9
RESUMO	10
<i>ABSTRACT</i>	11
1. INTRODUÇÃO	12
1.1. PLANTAS MEDICINAIS	12
1.2. O GÊNERO <i>Solidago</i>	12
1.3. O PROCESSO INFLAMATÓRIO	14
1.4. MODELOS DE INFLAMAÇÃO	17
2. OBJETIVOS	18
2.1. OBJETIVO GERAL	18
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3. ARTIGO SUBMETIDO À PUBLICAÇÃO – Journal of Pharmacy and Pharmacology	19
4. DISCUSSÃO	36
5. CONCLUSÕES	41
6. PERSPECTIVAS	43
REFERÊNCIAS	44
ANEXO 1: Protocolo do estudo antiinflamatório do mecanismo de ação da <i>Solidago chilensis</i> Meyen	53
ANEXO 2: Protocolo e cadastro da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)	55

LISTA DE ABREVIÇÕES

ADA	Adenosina-deaminase
ADA-1	Adenosina-deaminase isoforma 1
ADA-2	Adenosina-deaminase isoforma 2
AE	Extrato aquoso das raízes de <i>Solidago chilensis</i>
AR	Resíduo aquoso do extrato aquoso das raízes de <i>Solidago chilensis</i>
BuOH	Fração butanólica do extrato aquoso das raízes de <i>Solidago chilensis</i>
C-C	Classe de quemocinas quimiotáticas para células mononucleares
CEUA	Comissão de ética no uso de animais
Cg	Carragenina
CLP	Modelo experimental de sepse induzido por ligação do ceco e punção
COX-2	Ciclooxigenase tipo 2
C-X-C	Classe de quemocinas quimiotáticas para neutrófilos
C-X-CR1	Receptor para quemocinas C-X-C
C-X-CR2	Principal receptor para KC
CV	Coefficiente de variação
DSS	Dextran sulfato de sódio
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HOCl	Ácido Hipocloroso
i.p.	Via intraperitoneal
i.v.	Via intravenosa
ICAM-1	Moléculas de adesão intracelular tipo 1
IL	Interleucina
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
IL-1 β	Interleucina-1 beta
I- κ B	Proteína inibidora do fator de transcrição nuclear NF-kappa B
KC	Quemocina para neutrófilos
LOX	Lipooxigenase
LPS	Lipopolissacarídeo
MPO	Mieloperoxidase
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NF- κ B	Fator de transcrição nuclear kappa B
NK	Célula Natural Killer
NO	Óxido nítrico
NO ^x	Concentrações de nitrato/nitrito
NOS	Óxido nítrico sintase
eNOS	Óxido nítrico sintase constitutiva, expressa em células endoteliais
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
nNOS	Óxido nítrico sintase constitutiva, expressa em células neuronais
NO ₃ ⁻	Nitrato
NO ₂ ⁻	Nitrito
O ₂ ⁻	Ânion Superóxido
ONO-1714	Inibidor seletivo da óxido nítrico sintase induzida
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PNP	Purina Nucleosídeo Fosforilase
RAW 264.7	Linhagem de macrófagos de camundongos
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
RNS	Espécies reativas de nitrogênio
ROS	Espécies reativas de oxigênio
s.c.	Via subcutânea
SOD	Superóxido dismutase
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa

TPA
UFSC

(12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato)
Universidade Federal de Santa Catarina

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 *Solidago chilensis* Meyen 12
- Figura 2 Mecanismo de ação antiinflamatória proposto para a *Solidago* 42
chilensis Meyen

RESUMO

Estudo do efeito antiinflamatório da *Solidago chilensis* Meyen em modelo de inflamação induzida pela carragenina, em camundongos.

Introdução: Espécies do gênero *Solidago* têm sido utilizadas na medicina popular de diversos países no tratamento de infecções e na inflamação. **Objetivo:** O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito antiinflamatório do extrato aquoso (AE) e de duas frações isoladas: fração butanólica (BuOH) e resíduo aquoso (AR) das raízes de *Solidago chilensis* Meyen, sobre os níveis de leucócitos, exsudação, mieloperoxidase (MPO), adenosina-deaminase (ADA), óxido nítrico (NO^x), interleucina-1 beta ($\text{IL-1}\beta$), quemocina para neutrófilos (KC), e fator de necrose tumoral-alfa ($\text{TNF-}\alpha$), utilizando o modelo de inflamação induzida pela carragenina na bolsa de ar, em camundongos. **Metodologia:** As raízes da *Solidago chilensis* foram submetidas à extração, sob infusão. O extrato foi filtrado e uma alíquota liofilizada em Edward® (Edward®, EUA). Parte deste extrato foi fracionada com n-BuOH, resultando nas frações butanólica (BuOH) e resíduo aquoso (AR). Nos ensaios *in vivo* utilizaram-se camundongos albinos suíços de 2 meses de idade de ambos os sexos. Neste protocolo experimental, a bolsa de ar foi induzida em diferentes grupos, por meio da administração de 1,5 mL de ar durante três dias alternados. No sexto dia, a inflamação foi induzida pela administração de 0,5 mL de carragenina (Cg 1%, s.c.). Para analisar o efeito antiinflamatório do extrato e suas frações, diferentes grupos de animais foram tratados com AE (10-200 mg/kg, i.p.), BuOH ou AR (10-50 mg/kg, i.p.), 0,5 h antes da indução da inflamação. Os parâmetros inflamatórios foram avaliados 24 h após. A diferença estatística entre os grupos foi determinada pela análise dos testes estatísticos de variância (ANOVA) e pelo teste de Dunnett ou teste *t* de Student. Valores de $P < 0.05$ foram considerados significativos. **Resultados:** O extrato aquoso das raízes de *Solidago chilensis* (50-200 mg/kg) e suas frações (10-50 mg/kg, i.p.) reduziram significativamente os níveis de leucócitos, neutrófilos e exsudação ($P < 0,01$). Além disso, o material vegetal inibiu as atividades de MPO e ADA, além dos níveis de NO , $\text{IL-1}\beta$, $\text{TNF-}\alpha$ e KC ($P < 0,05$). A indometacina e a dexametasona inibiram todos os parâmetros estudados ($P < 0,01$), exceto a indometacina, que não inibiu os níveis de $\text{TNF-}\alpha$ ($P > 0,05$) e a dexametasona, que não inibiu os níveis de KC ($P > 0,05$). **Conclusão:** O extrato aquoso e as frações isoladas da *Solidago chilensis* demonstraram importante atividade antiinflamatória, inibindo não somente os mediadores pró-inflamatórios liberados na inflamação pela carragenina, mas a infiltração de leucócitos para o sítio da inflamação. Além disso, os resultados obtidos com a *Solidago chilensis* são semelhantes àqueles obtidos com os animais tratados com indometacina ou dexametasona, indicando que estes podem ter uma via comum de ação antiinflamatória.

Unitermos: *Solidago chilensis* Meyen, atividade antiinflamatória, bolsa de ar, leucócitos, citocinas, exsudação.

ABSTRACT

Study of anti-inflammatory effect of *Solidago chilensis* Meyen on a murine air pouch model.

Background: *Solidago* species have been used in popular medicine in numerous countries for the treatment of several conditions of infection and inflammation.

Objectives: The aim of this study was to evaluate the efficacy of the anti-inflammatory properties of *Solidago chilensis* Meyen and its two derived fractions: butanolic (BuOH) and aqueous residual (AR) of rhizomes upon leukocytes, exudation, myeloperoxidase (MPO) and adenosine-deaminase (ADA) activities, as well as nitrate/nitrite concentrations (NO^x), interleukin-1 beta ($\text{IL-1}\beta$) and tumor necrosis factor alpha ($\text{TNF-}\alpha$) levels in the acute inflammation model, in mice.

Methodology: *Solidago chilensis* Meyen rhizomes were extracted using hot water at 90°C under infusion. The extract was filtered and lyophilized. Part of the aqueous extract (AE) was partitioned with n-butanol, resulting in butanolic (BuOH) and aqueous residual (AR) fractions. In the *in vivo* experiments adult Swiss mice weighing from 18 to 20 g were used. The air pouch model was induced by the administration of 1.5 mL of air during alternate days in different groups of animals for air pouch formation. On the sixth day, the inflammation was induced by 0.5 mL of carrageenan (Cg 1%, s.c.). Different groups of animals were treated with AE (10-200 mg/kg, i.p.), BuOH or AR (10-50 mg/kg, i.p.) 0.5 h before Cg administration. The inflammatory parameters: leukocytes, exudation, myeloperoxidase (MPO), adenosine-deaminase (ADA) activities, nitric oxide (NO^x), interleukin-1 beta ($\text{IL-1}\beta$) and tumor necrosis factor-alpha ($\text{TNF-}\alpha$) levels were evaluated after 24 h. Indomethacin (5 mg/kg) and dexamethasone (0.5 mg/kg) were used as reference drugs in all experiments. **Results:** The aqueous extract (10-200 mg/kg, i.p.) and its derived fractions (10-50 mg/kg, i.p.) significantly inhibited leukocytes, neutrophils, and exudation ($P < 0.01$). Furthermore, the plant inhibited the myeloperoxidase and adenosine-deaminase activities, as well as nitric oxide, $\text{IL-1}\beta$, KC and $\text{TNF-}\alpha$ levels ($P < 0.05$). Indomethacin and dexamethasone inhibited all the studied inflammatory parameters ($P < 0.01$) with exceptions that indomethacin did not inhibit $\text{TNF-}\alpha$ levels and dexamethasone did not inhibit KC levels ($P > 0.05$). **Conclusions:** These results indicate that *Solidago chilensis* Meyen has a significant anti-inflammatory action on acute inflammatory responses and its inhibitory activity may be due to not only to the inhibition of proinflammatory mediators, but also to the inhibition of leukocyte infiltration. Furthermore, the anti-inflammatory effect of *Solidago chilensis* was similar to that observed with the animals pretreated with indometachin and dexamethasone. These results may be relevant for potential new drug candidate or phytomedicine with anti-inflammatory properties.

Key words: *Solidago chilensis* Meyen, anti-inflammatory activity, air pouch, leukocytes, cytokines, exudation.

1. INTRODUÇÃO

1.1. PLANTAS MEDICINAIS

Atualmente, a pesquisa relacionada às propriedades químicas e farmacológicas de plantas medicinais está voltada à procura de substâncias com atividade biológica, no sentido de dar uma base científica à medicina popular (RATES, 2001; GIORGETTI; NEGRIS; RODRIGUES, 2007), ou para a obtenção de novas estruturas químicas de interesse para a indústria farmacêutica, com atividades farmacológicas específicas, podendo resultar em novos fármacos que possam apresentar menos efeitos colaterais.

1.2. GÊNERO *Solidago*

Espécies do gênero *Solidago* já têm sido tradicionalmente utilizadas na medicina popular no tratamento de processos inflamatórios e/ou infecciosos do trato urinário (MELZIG, 2004). Estudos *in vitro* e *in vivo* já demonstraram que o gênero *Solidago* possui importantes atividades biológicas. Dentre elas, destacam-se: efeito analgésico, (SAMPSON et al., 2000); antineoplásico (GROSS et al., 2002) antimicrobiano e antifúngico (CHOI et al., 2005a; DUARTE et al., 2005), além do efeito antioxidante (MCCUNE; JOHNS, 2002).



Figura 1 – *Solidago chilensis* Meyen

Fonte: http://www.chileflora.com/Florachilena/ImagesHigh/IMG_4517.jpg
Acesso em: 08/10/2007.

Várias espécies de *Solidago* sp. são encontradas em diferentes continentes, como a *Solidago virgaurea* na Ásia e Europa, a *Solidago canadensis* L., a *Solidago odora* Ait. e a *Solidago gigantea* L. na América do Norte (CHOI et al., 2005). Na América do Sul, dentre as espécies existentes, destacam-se: a *Solidago microglossa* ou a *Solidago chilensis*, sendo esta utilizada na medicina popular de vários países sul-americanos (CABRERA, 1974). No Brasil, a *Solidago* apresenta diferentes nomes populares, como “erva-lanceta”, “arnica”, “arnica-brasileira”, “arnica-do-campo”, “arnica-silvestre”, denominação derivada de uma espécie conhecida como *Arnica montana* (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1929).

Na medicina popular brasileira, esta planta tem sido utilizada como diurético, analgésico, antiinflamatório, no tratamento de queimaduras, doenças reumáticas, entre outros (MORS et al., 2000). Na Amazônia, folhas de *Solidago chilensis* são utilizadas no preparo de soluções e pomadas para o tratamento de ferimentos de pele e para furúnculos (COELHO; SILVA, 1995). Poucos estudos *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado atividade biológica da *Solidago chilensis*, também conhecida como *S. microglossa*, dentre eles destacam-se os trabalhos realizados por Morel et al. (2006) no qual evidenciaram atividade antimicrobiana da espécie. Além disso, em nosso laboratório também já foi demonstrada atividade antiinflamatória para a espécie *Solidago chilensis* (GOULART et al., 2007).

Das raízes de *Solidago chilensis* já foram isolados diterpenos (solidagenona) (SCHMEDA-HIRSCHMANN, 1987) que apresentaram atividade gastroprotetora no modelo de lesão gástrica induzida por ácido clorídrico, em camundongos (SCHMEDA-HIRSCHMANN et al., 2002). Das partes aéreas de *Solidago chilensis* foi isolado, em maior quantidade, o flavonóide quercitrina (TORRES et al., 1987), ao qual foi atribuída atividade antioxidante utilizando-se ensaios *in vitro* (APÁTI et al., 2006).

Estudos farmacológicos demonstraram ainda, que os flavonóides possuem importante atividade antiinflamatória como, por exemplo, a inibição da via da ciclooxygenase e da lipooxygenase (KIM et al., 2002). Além disso, também foi demonstrado que estas substâncias possuem atividades antioxidante (MCCUNE; JOHNS, 2002).

A quercetina também possui atividade antiinflamatória como, por exemplo, inibe a liberação de prostanóides tanto em modelos *in vitro* (SHEN et al., 2002) como *in vivo* (MORIKAWA et al., 2003).

Da mesma forma, estudos demonstraram que as saponinas possuem atividade antiinflamatória, uma vez que estas inibiram a óxido nítrico sintase induzida (iNOS), a ciclooxigenase-2 (COX-2) e a lipooxigenase (LOX), em modelos *in vivo* (SAYYAH et al., 2004).

Uma vez que estudamos o efeito antiinflamatório da *Solidago chilensis* Meyen em modelo experimental, vale a pena comentar sobre o processo inflamatório que, apesar de ser uma resposta fisiológica, pode promover lesão ao organismo.

1.3. PROCESSO INFLAMATÓRIO

A reação inflamatória é uma resposta de defesa do organismo na tentativa de reparo tecidual. Esta resposta envolve uma série de eventos celulares e liberação de enzimas e mediadores químicos, dentre eles destacam-se: o óxido nítrico (SANCHAYITA; ABRAHAM, 2006; SCHMID-SCHÖBEIN, 2006; MARIOTTO et al., 2007; TSUCHIYA et al., 2007), a mieloperoxidase (ARATANI, 2006; ARATANI et al., 2006; KLEBANOFF, 2005; WINTERBOURN et al., 2006; HANSSON et al., 2006) e a adenosina-deaminase (ZAVIALOV; ENGSTRÖM, 2005), além das citocinas (MANDERSCHIED et al., 2004; SCHMID-SCHÖBEIN, 2006) e quemocinas (SPEYER et al., 2004; SCHMID-SCHÖBEIN, 2006). Como consequência da liberação destes mediadores, ocorre o aumento da permeabilidade vascular, a angiogênese e apoptose celular, além de outros eventos (SCHMID-SCHÖBEIN, 2006).

Na resposta imune inata ou não adaptativa ocorre a ativação das células fagocíticas, dentre elas destacam-se os neutrófilos, as primeiras células a migrar para o local da lesão (SCHMID-SCHÖBEIN, 2006).

Outro importante grupo de células fagocíticas são os mononucleares composto pelos monócitos, que são leucócitos circulantes e pelos macrófagos, que são células residentes responsáveis pela fagocitose e liberação de espécies reativas do oxigênio, além das citocinas (MANTOVANI; SICA; LOCATI, 2007).

Dentre as enzimas liberadas na resposta inflamatória cita-se a mieloperoxidase (MPO), que está relacionada à defesa do hospedeiro. No entanto, em algumas situações pode contribuir para lesão tecidual (KLEBANOFF, 2005; ARATANI, 2006; ARATANI et al., 2006; HANSSON et al., 2006).

A mieloperoxidase é sintetizada principalmente por neutrófilos além de células precursoras de monócitos (KLEBANOFF, 2005; HANSSON et al., 2006) e catalisa a produção do ácido hipocloroso (HOCl), metabólito com importante atividade microbica (WINTERBOURN et al., 2006). Esta reação ocorre a partir da liberação de íons cloreto (Cl^-) e de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) presentes nos fagossomas. Este é sintetizado, principalmente, no processo do metabolismo oxidativo também denominado de “*burst respiratório*” que ocorre nas células fagocíticas, através da enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase (KLEBANOFF, 2005; ARATANI, 2006; ARATANI et al., 2006). A NADPH oxidase converte o oxigênio molecular (O_2) no ânion superóxido (O_2^-), o qual é convertido em H_2O_2 pela enzima superóxido dismutase (SOD) (ARNHOLD, 2004; WINTERBOURN et al., 2006). Este radical, juntamente com o HOCl e outras espécies reativas de oxigênio (ROS), é responsável pela atividade microbica da MPO no interior dos fagossomas dos neutrófilos (ARNHOLD, 2004).

A adenosina-deaminase (ADA) é uma outra enzima também envolvida na resposta inflamatória. Esta enzima catalisa a reação de desaminação da adenosina e 2-desoxiadenosina em inosina e desoxinosina, respectivamente. Estes metabólitos são catabolizados através da degradação das purinas pela enzima purina nucleosídeo fosforilase (PNP) (VANNONI et al., 2004). Estudos *in vivo* demonstraram a presença de pelo menos duas isoenzimas (ADA1 e ADA2), liberadas principalmente por macrófagos e monócitos circulantes (CONLON; LAW, 2004). Nos seres humanos, também já foram identificadas ambas as isoenzimas (ZAVIALOV; ENGSTRÖM, 2005).

Outro mediador importante é o óxido nítrico (NO). Este mediador é um gás solúvel e está relacionado a várias funções fisiológicas, incluindo transmissão neuronal, relaxamento vascular, imunomodulação e citotoxicidade (TSUCHIYA et al., 2007). Esta substância é liberada a partir da reação de conversão da L-arginina em L-citrulina, catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS). Pelo menos três isoformas desta enzima são conhecidas: duas são constitutivas, presentes em condições fisiológicas: NOS endotelial (eNOS) e NOS neuronal (nNOS). A terceira é a NOS induzida (iNOS), liberada por meio de um estímulo como a resposta inflamatória (TAKEUCHI et al., 2004; MARIOTTO et al., 2007). A iNOS catalisa a formação de espécies reativas de nitrogênio (RNS) no local do estímulo inflamatório, além de promover a ativação do fator de transcrição nuclear- κB (NF- κB), um dos

principais fatores responsáveis por regular a expressão de vários mediadores pró-inflamatórios (OKAMOTO et al., 2004; KELLEHER et al., 2007).

As citocinas também são mediadores liberados por neutrófilos, linfócitos, macrófagos, dentre outras células (MANDERSCHEID et al., 2004). Estes mediadores, dependendo do estímulo, possuem efeitos pró ou antiinflamatórios. O balanço entre estas citocinas tem um papel fundamental na defesa do hospedeiro (WILSON et al., 2005; MALAVIYA, 2006;). As principais citocinas secretadas pelas células fagocíticas ativadas incluem: o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), a interleucina-1 beta (IL-1 β) e as quemocinas da família C-X-C como interleucina-8 (IL-8) em humanos e quemocina para neutrófilos (KC), em camundongos (MANDERSCHEID et al., 2004).

O TNF- α liberado no local da resposta inflamatória promove a ativação celular e a liberação de outras citocinas e mediadores químicos. Como consequência, ocorre também a expressão de moléculas de adesão no endotélio e nos leucócitos o que denota a quimiotaxia celular do vaso para o tecido lesado (SEELY et al., 2003). Estudos experimentais têm demonstrado a participação do TNF- α na resposta inflamatória em processos infecciosos (MONTAG et al., 2006), doenças auto-imunes (WILSON et al., 2005) e em situações de trauma (HIETBRINK et al., 2006). Estudos também têm demonstrado o envolvimento do TNF- α em diversas doenças de caráter inflamatório, dentre elas citam-se: o diabetes (UNO et al., 2007), a aterosclerose (ZHANG et al., 2007a), a artrite reumatóide (TOUSSIROT; WENDLING, 2007) e a psoríase (TOBIN; KIRBY, 2005).

A IL-1 β é uma citocina com atividade pró- ou antiinflamatória e liberada principalmente por macrófagos (CHANG et al., 2004). Esta citocina atua próximo à célula em que foi liberada e ativa a liberação de TNF- α pelos macrófagos, células endoteliais, linfócitos e fibroblastos e IL-6 por macrófagos e células hepáticas (HIETBRINK et al., 2006). Tanto o TNF- α como a IL-1 β , além da IL-6, estimulam a produção e a liberação de IL-8, uma importante quemocina responsável pela quimiotaxia neutrofílica (SPEYER et al., 2004; HIETBRINK et al., 2006).

A IL-1 β também está envolvida em diversas doenças de caráter inflamatório, dentre elas citam-se: o diabetes tipo 1 (ARIBI et al., 2007), as doenças articulares (FAN et al., 2007), as neoplasias (ZHANG et al., 2007b) e os processos inflamatórios agudos (BHATIA; MOOCHHALA, 2005).

Já as quemocinas são classificadas em diferentes famílias, sendo as principais C-X-C e C-C. As quemocinas da família C-X-C ligam-se a receptores com sete domínios transmembranares (C-X-CR1 e C-X-CR2) (DI CIOCCIO et al., 2004) e fazem a quimiotaxia especificamente de neutrófilos, enquanto que as C-C regulam a migração das células mononucleares (SPEYER et al., 2004). Estudos experimentais têm demonstrado a participação destas quemocinas em processos inflamatórios, como na lesão pulmonar aguda (REUTERSHAN et al., 2006), na sepse (SPEYER et al., 2004) e nos processos infecciosos (MANDERSCHIED et al., 2004). Além disso, em diversas doenças estas quemocinas também têm sido estudadas, como por exemplo, na aterosclerose (BOISVERT et al., 2006), na colite ulcerativa (EGESTEN et al., 2007), na neoplasia (ZOU; HU, 2007; ALI; LAZENNEC, 2007) e na doença pulmonar obstrutiva crônica (BRACKE et al., 2007).

1.4. MODELOS DE INFLAMAÇÃO

Para a avaliação do mecanismo de ação antiinflamatória de diferentes fármacos e plantas, há modelos de inflamação já descritos, como a bolsa de ar, a pleurisia, o edema de pata, a artrite e o implante de esponjas embebidas em agentes irritantes (SEDGWICK; WILLOUGHBY, 1985).

Okudaira e Schuwarz (1962) foram os primeiros pesquisadores que descreveram o modelo da bolsa de ar, em ratos. Em camundongos, o primeiro relato é de Clark, em 1975. Através deste modelo experimental, a partir do lavado obtido da cavidade da bolsa de ar é possível quantificar: o extravasamento das proteínas plasmáticas (exsudação) e a migração celular, e ainda, avaliar os níveis de diversos mediadores relacionados ao processo inflamatório.

Neste trabalho, optou-se pelo modelo experimental da bolsa de ar, uma vez que esta técnica está padronizada no laboratório, é de fácil execução e é considerado um bom modelo para avaliar mecanismo de ação de plantas ou fármacos que possuem propriedades antiinflamatórias. Além disso, este modelo mimetiza a resposta inflamatória que ocorre na sinóvia de pacientes com artrite reumatóide (SEDGWICK; LEES, 1986), portanto um bom modelo para avaliar atividade antiinflamatória de plantas e/ou fármacos.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Estudar a ação e o mecanismo de ação antiinflamatória do extrato aquoso e das frações isoladas das raízes de *Solidago chilensis* Meyen no modelo experimental da bolsa de ar na inflamação induzida pela carragenina, em camundongos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Avaliar o efeito antiinflamatório do extrato aquoso e das frações isoladas das raízes de *Solidago chilensis* sobre a migração dos leucócitos (polimorfonucleares e mononucleares) e a exsudação no lavado da bolsa de ar de animais tratados com carragenina.
- II. Investigar o efeito do extrato aquoso e das frações isoladas das raízes de *Solidago chilensis* sobre a atividade das enzimas pró-inflamatórias mieloperoxidase (MPO) e adenosina-deaminase (ADA), bem como a concentração de nitrito/nitrato (NO^x), obtidos no lavado da bolsa de ar na inflamação induzida pela carragenina.
- III. Analisar o efeito do extrato aquoso e das frações isoladas das raízes de *Solidago chilensis* sobre os níveis das citocinas interleucina-1 beta ($\text{IL-1}\beta$), fator de necrose tumoral alfa ($\text{TNF-}\alpha$) e da quimocina para neutrófilos (KC) obtidos no lavado da bolsa de ar na inflamação induzida pela carragenina.

3. ARTIGO SUBMETIDO À PUBLICAÇÃO – Journal of Pharmacy and Pharmacology

The anti-inflammatory modulatory role of *Solidago chilensis* Meyen in the murine model of air pouch

Rafael Liz^a, Silvana Virginia Gagliotti Vigil^a, Stella Goulart^a, Maria Izabel Goularte Moritz^b, Eloir Paulo Schenkel^b and Tânia Silvia Fröde^{a*}

Shortened title: anti-inflammatory effect of *Solidago chilensis* Meyen

^aDepartment of Clinical Analysis, Centre of Health Sciences, Federal University of Santa Catarina, Campus Universitário - Trindade, 88040-970, Florianópolis, SC, Brazil.

^bDepartment of Pharmaceutical Science, Centre of Health Sciences, Federal University of Santa Catarina, Campus Universitário - Trindade, 88040-970, Florianópolis, SC, Brazil.

* **Correspondence:** T. S. Fröde, Department of Clinical Analysis, Centre of Health Sciences, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil, Phone: +55 48 99614846, FAX: +55 48 32440936, E-mail address: saleh@ccs.ufsc.br or taniafrode@zipmail.com.br.

Acknowledgements and funding: We are grateful to Karen Luise Lang for locating and collecting the plant material and to Daniel Falkenberg for plant identification and herbarization. This study was supported by stipends and grants provided by the Brazilian agencies FAPESC (SC, Brazil), and CAPES and CNPq (Brazil). This work represents a part of Rafael Liz's Master of Science Dissertation on the Postgraduate Program of Pharmacy at the Federal University of Santa Catarina (Brazil).

Abstract

The aim of this study was to investigate the anti-inflammatory efficacy of the aqueous extract, (AE) and its butanolic (BuOH) and aqueous residual (AR) fractions, derived from rhizome of *Solidago chilensis* Meyen in inflammation caused by carrageenan, in mice. **Methodology:** *Solidago chilensis* Meyen rhizome was extracted using hot water at 90°C under infusion. The extract was filtered and lyophilized in an Edward® freeze-dryer. Part of the aqueous extract was fractionated with n-BuOH, resulting in BuOH and AR fractions. Adult Swiss mice were used in the *in vivo* experiments. The air pouch model was induced in accordance to the methodology described by Benincá et al (2007). **Results:** The aqueous extract and its derived fractions significantly inhibited leukocytes, neutrophils, exudation, myeloperoxidase and adenosine-deaminase activities, as well as nitric oxide, IL-1 β , KC and TNF- α levels ($P < 0.05$). Indomethacin and dexamethasone inhibited all the studied inflammatory parameters ($P < 0.01$) with exceptions that indomethacin did not inhibit TNF- α levels and dexamethasone did not inhibit KC levels ($P > 0.05$). **Conclusions:** These results indicate that *Solidago chilensis* Meyen has a significant anti-inflammatory action on acute inflammatory responses and their inhibitory activity may be due to not only to the inhibition of proinflammatory mediators, but also to the inhibition of leukocyte infiltration.

Key words: *Solidago chilensis* Meyen, anti-inflammatory activity, air pouch, leukocytes, cytokines, exudation.

Introduction

Species of the genus *Solidago* are used in traditional medicine in several countries. Herbal remedies based on goldenrod (*Solidago virgaurea*) have been well-used over centuries in the treatment of urinary tract diseases. The herbal preparations have a complex action spectrum (anti-inflammatory, antimicrobial, diuretic, antispasmodic, analgesic) and are especially recommended for the treatment of infections and inflammations (Melzig 2004). Studies *in vivo* and *in vitro* have also demonstrated that this species has important biological activities (Metzner et al 1984; Sampson et al 2000; Gross et al 2002; Choi et al 2005).

In South America the most abundant species is *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae), widely used in popular medicine of several countries of this continent (Cabrera 1974). It is included in the first edition of the Brazilian Pharmacopea under the drug names “erva-lanceta” and “arnica silvestre” (Brazilian Pharmacopea 1929), the latter denomination being derived from its usage as a substitute for *Arnica montana*. Moreover, in Brazilian popular medicine, it is recommended as a diuretic, analgesic, anti-inflammatory, to treat burns and rheumatic disease, among other treatments (Mors et al 2000; Lorenzi & Matos 2002). However, there are few studies *in vivo* and/or *in vitro* to demonstrate the biologic activity of this species, although one has indicated that *Solidago chilensis* (*Solidago microglossa*) has anti-microbial activity (Morel et al 2006).

In the case of goldenrod, flavonoids such as quercitrin and hyperoside are considered the main active constituents with anti-inflammatory activity. For the European goldenrod the presence of flavonoids has also been reported and, additionally, a phenolic acid derivative named leiocarposide, which is also considered an active component in relation to anti-inflammatory activity, according to *in vivo* assays (Metzner et al 1984). In the case of *Solidago chilensis*, notwithstanding its wide utilization and presence in the Brazilian Pharmacopoea, the pharmacological and chemical investigations are rather scarce. Previous studies have revealed that aqueous extracts of rhizome, and also leaves, have important anti-inflammatory properties. In this study, the aqueous extract of rhizome of *Solidago chilensis* Meyen and its derived fractions, significantly inhibited leukocytes, exudation and pro-inflammatory mediators in the mouse model of pleurisy induced by carrageenan (Goulart et al 2007).

From the chemical point of view, the flavonoid quercitrin has been reported as one of the main components in the aerial parts (Gutierrez et al 1981; Sanchez de Medina, 2002) and the labdane diterpene solidagenone as the main component in the rhizome (Schmeda-Hirschmann 1987).

In this paper, following an investigation using the mouse model of pleurisy induced by carrageenan (Goulart et al 2007), we report on an investigation into the effect of the aqueous extract and its derived fractions obtained from rhizome of *Solidago chilensis* Meyen, aiming to evaluate the anti-inflammatory properties of these compounds, observing their effect on leukocytes, exudation, myeloperoxidase, nitric oxide, adenosine-deaminase, interleukin-1 beta (IL-1 β), neutrophil's chemokine (KC) and tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) levels in an experimental animal model of acute inflammation caused by carrageenan.

Materials and methods

Plant materials

The rhizome of *Solidago chilensis* Meyen were collected in Caibi, a town located in the State of Santa Catarina, Brazil. They were collected in March 2005, and were identified by the botanist Prof. Dr. Daniel Falkenberg of the Department of Botany at the Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil, where a voucher specimen (FLOR34674) was deposited.

Preparation of the extract and its derived fractions

Solidago chilensis Meyen rhizome was air-dried at room temperature for 7 days. Subsequently, extracts were filtered and concentrated with a rotaevaporator apparatus to obtain the aqueous extract. The powdered rhizome was extracted using hot water at 90°C (plant: solvent, 1:10, w/v) under infusion for 10 min, yielding 12%. Extracts were then filtered and an aliquot was lyophilized (Edward[®] E-C Micromodulyo Freeze-Dryer, USA). Part of the aqueous extract of the rhizome was partitioned three times with 50 mL of n-butanol, resulting in the butanolic fraction (yield 12.9%) and aqueous residual fraction (yield 87.1%). These fractions were evaporated under reduced pressure at a temperature below 50° C, yielding dry residues, referred to in this study as the butanolic (BuOH) and aqueous residual (AR) fractions.

Animals

Swiss mice, weighing 18-25 g, were housed under standardized conditions (room at constant temperature ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) with alternating 12 h periods of light and darkness), humidity 50-60%, and were fed on a standard mouse diet with water *ad libitum* before use. This study was approved by the Committee for Ethics in Animal Research of UFSC (Protocol number- 23080.007042/2006-28).

Experimental protocol

In this protocol, different groups of animals received air injection on three alternate days to induce the air pouch. On the sixth day, animals received carrageenan (Cg: 1% administered by subcutaneous route (s.c.), and 24 h later they were killed by an overdose of ether (Benincá et al 2007). Animals were fixed on a surgical table and an incision in the dorsal skin was made to perforate the air pouch. The cavity was washed with 1.0 mL of sterile PBS (pH 7.6, composition mmol: NaCl 137, KCl 2.7 and phosphate buffer salts 10) containing heparin (20 IU/mL). Cell migration, exudation, myeloperoxidase (MPO) and adenosine-deaminase (ADA) activities as well as nitrate/nitrite concentration (NO^x), interleukin-1 beta ($\text{IL-1}\beta$), neutrophil's chemokine (KC) and tumoral necrosis factor-alpha ($\text{TNF-}\alpha$) levels were evaluated 24 h after phlogogen administration.

Indomethacin (5.0 mg/kg) and dexamethasone (0.5 mg/kg) were used as reference drugs.

Initially, the effect of the aqueous extract (AE) and its derived fractions (BuOH and AR) obtained from rhizome of *Solidago chilensis* Meyen on the inflammation induced by carrageenan in the air pouch, in mice, was evaluated. In this protocol, different groups of animals were treated (0.5 h before) with different doses of AE (10-200 mg/kg), BuOH or AR fractions (10-50 mg/kg) administered by intraperitoneal route (i.p.). The inflammatory parameters (cell migration and exudation) were analyzed 24 h after carrageenan administration.

In another set of experiments employed to establish the time course profile, different groups of animals were pre-treated with one dose of aqueous extract, BuOH fraction or AR fraction at different time points (0.5-4 h) and the same inflammatory parameters were evaluated 24 h after carrageenan administration.

According to this protocol, the aqueous extract (100 mg/kg), BuOH fraction (10 or 25 mg/kg) or AR fraction (25 or 50 mg/kg), administered 0.5 h before carrageenan induction, was elected as doses to be used in the following experiments.

The aqueous extract and its derived fractions, as well as indomethacin and dexamethasone, were administered 0.5 h prior to inflammation induction.

Quantification of cell migration and exudation

After killing animals, samples of the air pouch cavity fluid were collected to determine the total and differential leukocyte contents, and exudation. Total leukocyte counts were determined in a Neubauer chamber, and cytospin preparations of exudates were stained with May-Grünwald-Giemsa for the differential count (Saleh et al 1996).

The degree of exudation was determined by the measurement of the amount of Evans blue dye extravasation in the exudate as previously described (Benincá et al 2007). Thus, in each experimental group, animals were challenged 0.5 h after the inflammation induction with a solution of Evans blue dye (25 mg/kg) administered by intravenous route (i.v.) in order to evaluate the exudation in the air pouch cavity. On the day of the experiment, a batch of stored samples was thawed at room temperature and the amount of dye was estimated by colourimetry using an Elisa plate reader (Organon Teknika, Roseland, NJ, USA) at 620 nm, by interpolation from a standard curve of Evans blue dye in the range of 0.01 to 50 µg/mL.

Quantification of myeloperoxidase and adenosine-deaminase activities

In-house assays of both myeloperoxidase and adenosine-deaminase were employed according to the method developed by Rao et al (1993) and Giusti and Galanti (1984). Using conventional reagents, the activity of each enzyme was estimated by means of colourimetric measurements (absorbances of 450 and 630 nm, respectively) in an ELISA plate reader (Organon Teknika, Roseland, NJ, USA). Results were expressed as mU/mL (MPO) and U/L (ADA).

Quantification of nitrate/nitrite concentration

Nitric oxide and its decomposition products nitrite (NO_2^-) and nitrate (NO_3^-) were measured using the Griess method (Green et al 1982). Samples of exudate were collected, separated and stored at -20°C . Levels of nitrate/nitrite were

determined as previously described by Saleh et al (1999). Results were expressed as μM .

Quantification of IL-1 β , KC and TNF- α level

Samples of exudate were collected and immediately prepared for the analysis of cytokine levels. In this protocol, commercially available kits were used with monoclonal-specific antibodies for each cytokine. The cytokine levels were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), using kits according to the manufacturer's instructions. The range of values detected by these assays were: IL-1 β (100-6400 pg/mL), KC (23-1500 pg/mL) and TNF- α (5-2000 pg/mL). The intra- and inter-assay coefficients of variation (CV) for IL-1 β , KC and TNF- α were: intra CV: IL-1 β = $6.2 \pm 0.4\%$, KC = $9.7 \pm 0.9\%$ and TNF- α = $7.8 \pm 0.9\%$; inter CV: IL-1 β = $5.1 \pm 0.6\%$, KC = $4.1 \pm 0.9\%$ and TNF- α = $9.6 \pm 2.1\%$, with sensitivity values of IL-1 β = 1.7 pg/mL, KC = 23.0 pg/mL and TNF- α = 5.0 pg/mL. All cytokine concentrations were estimated by means of colourimetric measurements at 450 nm on an ELISA plate reader (Organon Teknika, Roseland, NJ, USA) by interpolation from a standard curve.

Drugs

The following drugs and reagents were used: carrageenan (degree IV), human neutrophil myeloperoxidase, indomethacin, (Sigma Chemical Co., St. Luis, MO, USA), dexamethasone, (Ache pharmaceutical laboratories S.A., São Paulo, SP, Brazil), Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for quantitative determination of rat IL-1 β and mouse KC (IBL - Immuno Biological Laboratories Co. Ltd., Fujioka-city, Gunma, Japan), mouse TNF- α (BD - Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA). Other reagents used were of analytical grade and were obtained from different commercial sources.

Data analysis

The data is reported as the mean \pm SEM. Significant differences between groups were determined by analysis of variance (ANOVA) complemented with Dunnett's and/or Student's *t* tests. $P < 0.05$ was considered significant.

Results

Effects of *Solidago chilensis*, indomethacin and dexamethasone on cellular migration and exudation

The aqueous extract of the rhizome of *Solidago chilensis* (50 to 200 mg/kg) significantly decreased the leukocyte migration from 34.3 ± 7.4 to 88.3 ± 1.4 % ($P < 0.05$) in comparison to the control group (Table 1). This extract (100 and 200 mg/kg) also inhibited neutrophils from 73.8 ± 2.2 to 93.6 ± 1.1 % ($P < 0.01$) and exudation from 43.7 ± 3.9 to 77.4 ± 1.9 % ($P < 0.01$) (Table 1). Under the same conditions this extract at doses of 10 and 25 mg/kg did not modify the studied inflammatory parameters ($P > 0.05$), except dose of 10 mg/kg that caused a significant increase of mononuclears by $216.0 \pm 4.8\%$ ($P < 0.01$) (Table 1).

The butanolic fraction (10 and 25 mg/kg) was effective in inhibiting leukocyte influx from 16.5 ± 3.6 to $36.6 \pm 3.5\%$ ($P < 0.05$) (Table 1), neutrophils from 29.5 ± 7.4 to $46.0 \pm 3.7\%$ ($P < 0.01$) and exudation from 25.4 ± 7.3 to 52.4 ± 5.3 % ($P < 0.05$) (Table 1). Nevertheless, it did not modify mononuclear cells migration ($P > 0.05$) (Table 1). The BuOH fraction at the dose of 50 mg/kg increased leukocytes by $16.4 \pm 4.8\%$ ($P < 0.05$), but did not inhibit neutrophils, mononuclear cells and exudation ($P > 0.05$) (Table 1).

The aqueous residual fraction (25 and 50 mg/kg) produced a significant decrease in leukocytes from 20.3 ± 7.4 to 44.2 ± 4.9 % ($P < 0.01$) (Table 1). Moreover, this fraction (10 to 50 mg/kg) also inhibited neutrophils from 38.9 ± 4.2 to 52.9 ± 5.5 % ($P < 0.05$) and exudation from $35.2 \pm 7.8\%$ to 37.2 ± 5.3 % ($P < 0.05$) (Table 1). The aqueous residual fraction at a dose of 10 mg/kg did not modify total leukocyte levels ($P > 0.05$), but it caused a significant enhancement of mononuclear cells by 40.4 ± 16.6 % ($P < 0.01$) (Table 1).

The time course profile for the aqueous extract of the rhizome of *Solidago chilensis* showed that the pre-treatment periods of 0.5 and 2 h were effective in inhibiting leukocytes and exudation induced by carrageenan in the present inflammation model ($P < 0.01$) (results not shown). However, its derived fractions (BuOH and AR) were effective in inhibiting the same inflammatory parameters only in the pre-treatment of 0.5 h (results not shown). The dose-response curve and time-course profile studied indicated that the inhibitory effects on leukocyte migration and exudation were optimal in animals injected 0.5 h before carrageenan administration

with AE (100 mg/kg), BuOH (10 or 25 mg/kg) or AR (25 or 50 mg/kg). For this reason, these doses and the pre-treatment period of 0.5 h were chosen for the subsequent experiments.

As expected, indomethacin (5.0 mg/kg, i.p.) or dexamethasone (0.5 mg/kg, i.p.) inhibited leukocytes, neutrophils and exudation in the inflammation induced by carrageenan in the mice air pouch model ($P < 0.01$) (Table 1).

Effects of *Solidago chilensis*, indomethacin and dexamethasone on myeloperoxidase and adenosine-deaminase activities and on nitrate/nitrite concentration

The pre-treatment of animals with the aqueous extract of rhizome (100 mg/kg) and its BuOH (25 mg/kg) and AR (25 or 50 mg/kg) fractions caused a significant decreased in myeloperoxidase (% of inhibition: AE: 56.5 ± 2.1 , BuOH: 57.0 ± 4.7 and AR: 48.4 ± 0.6) ($P < 0.01$) and adenosine-deaminase activities (% of inhibition: AE: 58.4 ± 9.0 , BuOH: 88.9 ± 2.4 and AR: 66.4 ± 3.3) ($P < 0.01$) (Table 2). Moreover, the aqueous extract of rhizome and its derived fractions also inhibited nitrate/nitrite levels (% of inhibition: AE: 40.3 ± 4.4 , BuOH: 57.0 ± 6.9 and AR: 31.4 ± 7.6) ($P < 0.01$) (Table 2).

The indomethacin and dexamethasone pre-treatment at the studied doses had an inhibitory effect on myeloperoxidase and adenosine-deaminase activities and nitrate/nitrite concentration ($P < 0.01$) (Table 2).

Effects of *Solidago chilensis*, indomethacin and dexamethasone on cytokine levels

The aqueous extract of rhizome (100 mg/kg) and its BuOH (10 or 25 mg/kg) and AR (25 or 50 mg/kg) fractions caused a significant inhibition of IL-1 β (% of inhibition: AE: 79.5 ± 4.6 , BuOH: 50.3 ± 8.7 and AR: 27.8 ± 3.9) ($P < 0.01$); KC (% of inhibition: AE: 28.5 ± 9.5 , BuOH: 71.9 ± 5.4 and AR: 64.7 ± 0.5) ($P < 0.05$) and TNF- α levels (% of inhibition: AE: 36.0 ± 2.8 , BuOH: 49.8 ± 1.9 and AR: 81.3 ± 2.2) ($P < 0.01$) (Table 3).

Indomethacin and dexamethasone also inhibited IL-1 β levels ($P < 0.01$) (Table 3). On the other hand, dexamethasone, but not indomethacin, inhibited TNF- α levels

($P < 0.01$) (Table 3). Indomethacin, but not dexamethasone, inhibited KC levels ($P < 0.01$) (Table 3).

Discussion

Inflammation may be defined as a condition or state into which tissues enter as a response to injury or insult. This event is caused by, among other factors, the release and/or activation of pro-inflammatory cytokines such as: IL-1 β , TNF- α , nitric oxide and other inflammatory mediators, as well as different types of cells (Schmid-Schönbein 2006). Furthermore, neutrophils are the most important and extensively studied cells involved in the acute inflammatory response. As the principal circulating phagocyte, neutrophils are the first and most abundant leukocyte to be delivered to the site of infection and/or inflammation (Seely et al 2003; Nathan 2006).

First of all, our results showed that *Solidago chilensis* and its derived two fractions significantly inhibited the production and release of proinflammatory mediators such as NO, TNF- α and IL-1 β , as well as activated leukocytes at the site of inflammation. These results are in agreement with those of Goulart et al (2007) who have demonstrated that the rhizome of *Solidago chilensis* significantly inhibited leukocytes, exudation and pro-inflammatory mediators and enzymes in the mouse model of pleurisy induced by carrageenan.

In this study, *Solidago chilensis* inhibited leukocytes, for the most part neutrophils in the mouse air pouch cavity. This effect was also associated with a decrease in myeloperoxidase activity. The myeloperoxidase system of neutrophils is important as a potent bactericidal oxidant (Klebanoff 2005) and it is directly proportional to chemotaxis and activated neutrophil infiltration into inflamed tissues in the inflammatory process (Smith et al 1994; Gaut et al 2001). In parallel, an important inhibition of adenosine-deaminase activity was also observed, an enzyme considered as a lymphocyte activated marker (Fröde & Medeiros 2001; Spicuzza et al 2006).

Solidago chilensis AE, BuOH or AR fractions also significantly decreased IL-1 β , KC, TNF- α levels, as well as nitric oxide concentration.

The tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) is a prototypical inflammatory and immunomodulatory cytokine expressed by activated macrophages, monocytes, neutrophils, T-cells and NK cells (Tian et al 2005). On the other hand, interleukin-1 beta (IL-1 β) is produced and released predominantly by macrophages (Chang et al

2004). Furthermore, IL-1 β , along with TNF- α , is a central mediator of the host inflammatory response with the ability to activate adhesion molecule expression, promoting the enhancement of leukocyte trafficking to the site of inflammation (Seely et al 2003; Ruth et al 2005). IL-1 β and TNF- α can also play an important role in releasing specific inflammatory cytokines (C-X-C chemokines) from activated cells (Seely et al 2003; Ruth et al 2005).

Neutrophil leukocytes play an essential role in the formation of iNOS-derived NO and nitrated proteins in inflammation. The NO-derived iNOS also has a role in stimulating further neutrophil accumulation at the site of inflammation (Greenacre et al 2002).

The neutrophil cell membrane also mediates the interaction of the neutrophil with the extracellular environment; it expresses a complex array of adhesion molecules and receptors for various ligands, including mediators, cytokines, immunoglobulins and membrane molecules in other cells. The neutrophil recruitment is dependent on the expression of adhesion molecules such as selectin and, particularly, intercellular adhesion molecule (ICAM-1), in endothelial cells that serve as ligands for both CD11a/CD18 and CD11b/CD18 on the neutrophil membrane (Seely et al 2003). In this context, the hypothesis that *Solidago chilensis* can inhibit adhesion molecules cannot be discarded.

Conclusions

Results showed that *Solidago chilensis* Meyen had significant inhibitory activity in the acute inflammation and inhibited not only inflammatory responses caused by carrageenan, but also acted in the suppression of activated leukocyte infiltration. All anti-inflammatory effects of *Solidago chilensis* Meyen in this experimental animal model were similar to those observed with animals pretreated with either indomethacin or dexamethasone. It is possible that *Solidago chilensis* Meyen has a similar anti-inflammatory mechanism of action as indomethacin and dexamethasone.

References

- Benincá, J.P., Montanher, A.B., Zucolotto, S.M., Schenkel, E.P., Fröde, T.S. (2007) Evaluation of the anti-inflammatory efficacy of *Passiflora edulis*. *Food Chem.* **104**: 1097-1105.
- Brazilian Pharmacopoea (1929) Companhia Editora Nacional, São Paulo, Brazil.
- Cabrera, A.L. (1974) Flora Ilustrada de Entre Rios, Parte VI, Tomo VI. INTA, Buenos Aires, Argentina.
- Chang, D.M., Shyue, S.K., Liu, S.H., Chen, Y.T., Yeh, C.Y., Lai, J.H., Lee, H.S., Chen, A. (2004) Dual biological functions of an interleukin-1 receptor antagonist–interleukin-10 fusion protein and its suppressive effects on joint inflammation. *Immunology.* **112**: 643–650.
- Choi, S.Z., Choi, S.U., Bae, S.Y., Pyo, S., Lee, K.R. (2005) Immunobiological activity of a new benzyl benzoate from the aerial parts of *Solidago virgaurea* var. *gigantea*. *Arch. Pharm. Res.* **28**: 49-54.
- Fröde, T.S., Medeiros, Y.S. (2001) Myeloperoxidase and adenosine-deaminase levels in the pleural fluid leakage induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. *Mediators Inflamm.* **10**: 223-227.
- Gaut, J.P., Yeh, G.C., Tran, H.D., Byun, J., Henderson, J.P., Richter, G.M., Brennan, M.L., Lysis, A.J., Belaaouai, A., Hotchkiss, R.S., Heinecke, J.W. (2001) Neutrophils employ the myeloperoxidase system to generate antimicrobial brominating and chlorinating oxidants during sepsis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**: 11961-11966.
- Giusti, G., Galanti, B. (1984) Adenosine deaminase: colourimetric method. In: Bergmeyer, H.U. (ed) *Methods of enzymatic analyses*, 3th ed. Verlag Chemie, Weinheim: Germany, pp 315-323.
- Green, I.C., Wagner, D.A., Glowski, J., Skipper, P.L., Wishnok, J.S., Tannenbaum, S.B. (1982) Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* **126**: 131-138.
- Greenacre, S.A., Rocha, F.A., Rawlingson, A., Meinerikandathevan, S., Poston, R.N., Ruiz, E., Halliwell, B., Brain, S.D. (2002) Protein nitration in cutaneous inflammation in the rat: essential role of inducible nitric oxide synthase and polymorphonuclear leukocytes. *British J. Pharmacol.* **136**: 985-994.
- Goulart, S., Moritz, M.I.G., Lang, K.L., Liz, R., Schenkel, E.P., Fröde, T.S. (2007) Anti-inflammatory evaluation of *Solidago chilensis* Meyen in a murine model of pleurisy. *J. Ethnopharmacol.* **113**: 346-353.
- Gross, S.C., Goodarzi G., Watabe M., Bandyopadhyay S., Pai S.K., Watabe K. (2002) Antineoplastic activity of *Solidago virgaurea* on prostatic tumor cells in an SCID mouse model. *Nutr. Cancer.* **43**: 76-81.
- Gutierrez, A.B., Oberti, J.C., Juliani, H.R. (1981) Constituents of *Solidago chilensis* (Compositae). *An. Asoc. Qmic. Arg.* **69**: 27-31.
- Klebanoff, S.J. (2005) Myeloperoxidase: friend and foe. *J. Leuk. Biol.* **77**: 1-28.

- Lorenzi, H., Matos, F.J.A. (2002) *Plantas Medicinais no Brasil - Nativas e exóticas*. Instituto Plantarum de Estudos da Flora, São Paulo, Brazil.
- Melzig, M.F. (2004) Goldenrond-a classical exponent in the urological phytotherapy. *Wien. Med. Wochenschr.* **154**: 523-527.
- Metzner, J., Hirschelmann, R., Hiller, K. (1984) Antiphlogistic and analgesic effects of leiocarposide, a phenolic bisglucoside from *Solidago virgaurea* L.. *Pharmazie* **39**: 869-870.
- Mors, W.B., Rizzini, C.T., Pereira, N.A. (2000) *Medicinal plants of Brazil*. Reference Publications, Algonac, USA.
- Morel, A.F., Dias, G.O., Porto, C., Simionatto, E., Stuker, C.Z., Dalcol, II. (2006) Antimicrobial activity of extractives of *Solidago microglossa*. *Fitoterapia*. **77**: 453-455.
- Nathan, C. (2006) Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat. Rev. Immunol.* **6**: 173-182.
- Rao, T.S., Curie, J.L., Shaffer, A.F., Isakson, P.C. (1993) Comparative evaluation of arachidonic acid (AA)-and tetradecanoylphorbol acetate (TPA)-induced dermal inflammation. *Inflammation* **17**: 723-741.
- Ruth, J.H., Amin, M.A., Wood, J.M., He, X. Samuel, S., Yi, N., Haas, C.S., Koch, A.E., Bullard, D.C. (2005) Accelerated development of arthritis in mice lacking endothelial selectins. *Arthritis Res. Ther.* **7**: 959-970.
- Saleh, T.S.F., Calixto, J.B.; Medeiros, Y.S. (1996) Anti-inflammatory effects of theophylline, cromolyn and salbutamol in a murine model of pleurisy. *Br. J. Pharmacol.* **118**: 811-819.
- Saleh, T.S.F., Calixto, J.B., Medeiros, Y.S. (1999) Effects of anti-inflammatory drugs upon nitrate and myeloperoxidase levels in the mouse pleurisy induced by carrageenan. *Peptides*. **20**: 949-956.
- Sanchez de Medina, F., Vera, B., Galvez, J., Zarzuelo, A. (2002) Effect of quercitrin on the early stages of hapten induced colonic inflammation in the rat. *Life Sci.* **70**: 3097-3108.
- Schmid-Schönbein, G.W. (2006) Analysis of Inflammation, *Ann. Rev. Biomed. Eng.* **8**: 93-151.
- Schmeda-Hirschmann, G. (1987) A labdan diterpene from *Solidago chilensis* roots. *Planta Med.* **2**: 179-180.
- Seely, A.J.E., Pascual, J.L., Cristou, N.V. (2003) Science review: Cell membrane expression (connectivity) regulates neutrophil delivery, function and clearance. *Critical Care* **7**: 291-307.
- Smith, J.A. (1994) Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword. *J. Leuk. Biol.* **56**: 672-686.

Sampson, J.H., Phillipson, J.D., Bowery, N.G., O'Neill, M.J., Houston, J.G., Lewis, J.A. (2000) Ethnomedicinally selected plants as sources of potential analgesic compounds: indication of *in vitro* biological activity in receptor binding assays. *Phytother. Res.* **14**: 24-29.

Spicuzza, L., Di Maria, G., Polosa, R. (2006) Adenosine in the airways: implications and applications. *Eur. J. Pharmacol.* **533**: 77-86.

Tian, B., Nowak, D.E., Brasier, A.R. (2005) A TNF-induced gene expression program under oscillatory NF-Kappa B control. *BMC Genomics* **6**: 137.

Table 1 – Effect of the aqueous extract (and its butanolic and aqueous residual fractions) of *Solidago chilensis*, indomethacin and dexamethasone on cellular migration and exudation in the inflammation induced by carrageenan.

Groups/Doses	Leukocytes (x10 ⁶)	Neutrophils (x10 ⁶)	Mononuclear cells (x10 ⁶)	Exudation (µg/mL)
C ^a	12.4 ± 0.6	10.5 ± 0.8	1.9 ± 0.5	17.2 ± 0.7
AE (10 mg/kg) ^b	15.2 ± 0.9	9.2 ± 0.8	6.0 ± 0.9**	15.6 ± 1.0
AE (25 mg/kg) ^b	11.3 ± 1.9	9.9 ± 1.6	1.4 ± 0.4	13.5 ± 1.8
AE (50 mg/kg) ^b	10.0 ± 1.0*	8.8 ± 0.8	1.2 ± 0.3	17.6 ± 1.8
AE (100 mg/kg) ^b	4.7 ± 0.2**	2.8 ± 0.2**	1.9 ± 0.6	9.7 ± 0.7**
AE (200 mg/kg) ^b	1.5 ± 0.2**	0.7 ± 0.1**	0.8 ± 0.1	3.9 ± 0.3**
BuOH (10 mg/kg) ^b	7.9 ± 0.4**	5.5 ± 0.4**	2.4 ± 0.4	8.2 ± 0.9**
BuOH (25 mg/kg) ^b	10.3 ± 0.4*	7.4 ± 0.8**	2.9 ± 0.4	12.9 ± 1.2*
BuOH (50 mg/kg) ^b	14.5 ± 0.6*	11.8 ± 0.8	2.7 ± 0.3	16.6 ± 0.6
AR (10 mg/kg) ^b	12.5 ± 0.6	7.9 ± 0.3*	4.6 ± 0.3**	15.0 ± 0.7*
AR (25 mg/kg) ^b	7.0 ± 0.6**	5.0 ± 0.6**	2.0 ± 0.2	10.8 ± 0.9**
AR (50 mg/kg) ^b	7.9 ± 2.5**	5.2 ± 1.6**	2.7 ± 1.0	10.2 ± 2.2**
Indo (5 mg/kg) ^b	4.9 ± 0.5**	3.2 ± 0.1**	1.7 ± 0.4	8.1 ± 0.5**
Dexa (0.5 mg/kg) ^b	7.5 ± 1.1**	4.6 ± 0.4**	2.9 ± 0.9	11.2 ± 1.6**

Aqueous extract (AE: 10 to 200 mg/kg), butanolic fraction (BuOH: 10 to 50 mg/kg) or aqueous residual fraction (AR: 10 to 50 mg/kg) of *Solidago chilensis* administered in different groups of animals 0.5 h before the inflammation induction by carrageenan (1%). C = control = response in animals treated only with carrageenan. Indo = response in animals pre-treated with indomethacin (5.0 mg/kg. i.p.). Dexa = response in animals pre-treated with dexamethasone (0.5 mg/kg. i.p.). * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$, a = administered by subcutaneous route (s.c.); b = administered by intraperitoneal route (i.p.). N = 5 to 8 animals.

Table 2 – Effect of the aqueous extract (and its butanolic and aqueous residual fractions) of *Solidago chilensis*, indomethacin and dexamethasone on myeloperoxidase, adenosine-deaminase and nitric oxide levels in the inflammation induced by carrageenan.

Groups/Doses	MPO (mU/mL)	ADA (U/L)	NO ^x (μM)
C ^a	414.4 ± 55.2	108.4 ± 14.4	11.4 ± 1.1
AE 100 mg/kg ^b	179.1 ± 12.2**	72.0 ± 13.4**	7.9 ± 1.0**
BuOH 25 mg/kg ^b	178.3 ± 19.6**	12.0 ± 1.5**	4.9 ± 0.8**
AR 25 mg/kg ^b	391.6 ± 27.4	36.4 ± 3.6**	9.2 ± 1.2
AR 50 mg/kg ^b	213.9 ± 2.6**	-	7.8 ± 0.9**
Indo 5 mg/kg ^b	229.5 ± 15.8**	40.4 ± 3.4**	6.7 ± 1.2**
Dexa 0.5 mg/kg ^b	290.9 ± 23.8**	39.1 ± 15.2**	5.4 ± 0.1**

Aqueous extract (AE: 100 mg/kg), butanolic fraction (BuOH: 25 mg/kg) or aqueous residual fraction (AR: 25 or 50 mg/kg) of *Solidago chilensis* administered in different groups of animals 0.5 h before the inflammation induction by carrageenan (1%). C = control = response in animals treated only with carrageenan. Indo = response in animals pre-treated with indomethacin (5.0 mg/kg. i.p.). Dexa = response in animals pre-treated with dexamethasone (0.5 mg/kg. i.p.). ** $P < 0.01$, a = administered by subcutaneous route (s.c.); b = administered by intraperitoneal route (i.p.). N = 5 to 8 animals.

Table 3 – Effect of the aqueous extract (and its butanolic and aqueous residual fractions) of *Solidago chilensis*, indomethacin and dexamethasone on IL-1 β , KC and TNF- α levels in the inflammation induced by carrageenan.

Groups/Doses	IL-1 β (pg/mL)	KC (pg/mL)	TNF- α (pg/mL)
C ^a	2066.0 \pm 4.0	40590.0 \pm 3539.0	5283.0 \pm 529.1
AE 100 mg/kg ^b	424.0 \pm 94.1**	29013.7 \pm 2000.0 *	3364.0 \pm 88.2**
BuOH 10 mg/kg ^b	1026.0 \pm 179.7**	11400.0 \pm 2209.0**	5608.0 \pm 204.3
BuOH 25 mg/kg ^b	-	-	2650.0 \pm 100.0**
AR 25 mg/kg ^b	1491.0 \pm 80.9**	14320.0 \pm 196.0**	4242.0 \pm 914.6
AR 50 mg/kg ^b	-	-	988.7 \pm 118.2**
Indo 5 mg/kg ^b	645.9 \pm 297.3**	12460.0 \pm 1679.0**	5225.4 \pm 325.4
Dexa 0.5 mg/kg ^b	24.3 \pm 5.2**	44830.0 \pm 412.5	2799.0 \pm 179.9**

Aqueous extract (AE: 100 mg/kg), butanolic fraction (BuOH: 10 or 25 mg/kg) or aqueous residual fraction (AR: 25 or 50 mg/kg) of *Solidago chilensis* administered in different groups of animals 0.5 h before the inflammation induction by carrageenan (1%). C = control = response in animals treated only with carrageenan. Indo = response in animals pre-treated with indomethacin (5.0 mg/kg. i.p.). Dexa = response in animals pre-treated with dexamethasone (0.5 mg/kg. i.p.). * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$, a = administered by subcutaneous route (s.c.); b = administered by intraperitoneal route (i.p.). N = 5 to 8 animals.

4. DISCUSSÃO

Neste estudo, avaliou-se o efeito antiinflamatório do extrato aquoso e das frações isoladas das raízes de *Solidago chilensis* no modelo da inflamação induzida pela carragenina na bolsa de ar, em camundongos. De acordo com os resultados obtidos, o extrato aquoso das raízes de *Solidago chilensis* foi efetivo em inibir a migração leucocitária, às custas principalmente de neutrófilos, o que caracteriza inibição da resposta inflamatória aguda (SCHMID-SCHÖNBEIN, 2006).

O efeito antiinflamatório foi caracterizado também pela inibição da exsudação. Estes resultados estão de acordo com os estudos previamente realizados por Goulart et al., (2007) que demonstraram que as raízes, folhas e inflorescências da *Solidago chilensis* possuem propriedades antiinflamatórias inibindo os leucócitos e a exsudação no modelo da pleurisia induzida por diferentes agentes flogísticos.

Além do extrato aquoso, as frações butanólica e resíduo aquoso também demonstraram importante efeito antiinflamatório, inibindo tanto a migração leucocitária como a exsudação. É importante salientar que a fração butanólica demonstrou efeito antiinflamatório mais proeminente, uma vez que doses menores (10-25 mg/kg) comparadas às do resíduo aquoso (25-50 mg/kg) inibiram os mesmos parâmetros de inflamação estudados (leucócitos e exsudação).

Uma vez que foi observada uma diminuição significativa na migração de neutrófilos, é importante comentar sobre as moléculas de adesão que são as responsáveis pela quimiotaxia destas células na resposta inflamatória. Estas moléculas são responsáveis pelo rolamento, adesão e transmigração dos leucócitos (SEELY et al., 2003; RUTH et al., 2005; HIETBRINK et al., 2006). Vários mediadores pró-inflamatórios, dentre eles, IL-1 β , TNF- α , óxido nítrico e proteínas do sistema complemento, são responsáveis pela expressão de moléculas de adesão, tanto no endotélio como nas células (SCHMID-SCHONBEIN, 2006). Assim, não podemos descartar a possibilidade de que o efeito na inibição da migração dos leucócitos deve-se à inibição de moléculas de adesão (SEELY et al., 2003; SCHMID-SCHÖNBEIN, 2006).

Outro importante fator envolvido no processo inflamatório é a exsudação. O material vegetal, estudado no presente trabalho, inibiu este parâmetro de inflamação. Além disso, a planta inibiu também as concentrações de nitrito/nitrato na

cavidade da bolsa de ar na inflamação pela carragenina. O óxido nítrico é um dos principais mediadores envolvidos na exsudação. Na inflamação, este mediador é liberado em grandes quantidades por meio da ativação da enzima óxido nítrico sintase induzida. Vários mediadores pró-inflamatórios podem ativar esta enzima, dentre eles se destacam as citocinas pró-inflamatórias do tipo IL-1 β e TNF- α (MARCUS et al., 2003; SUNG; WONG; 2007). Kohno et al., (2007) demonstraram a inibição na expressão de iNOS, COX-2 TNF- α e IL-1 β ao administrar ONO-1714, um inibidor seletivo da iNOS, utilizando o modelo da colite induzida por dextran sulfato de sódio (DSS), em camundongos.

Da mesma forma, o extrato aquoso e as duas frações foram efetivas em inibir a atividade de outra enzima relacionada à ativação de neutrófilos: a mieloperoxidase. Novamente a fração butanólica mostrou efeito antiinflamatório mais efetivo, uma vez que doses menores (25 mg/kg) inibiram esta enzima pró-inflamatória, quando comparada ao resíduo aquoso (50 mg/kg).

Esta enzima é liberada no fagossoma de neutrófilos ativados e sua atividade está diretamente relacionada à concentração destas células (KLEBANOFF, 2005; WINTERBOURN, 2006). Estudos realizados em nosso laboratório demonstraram que a MPO está diretamente associada à migração de neutrófilos ativados no modelo da pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos (MONTANHER et al., 2007; GOULART et al., 2007). Este fato revela que o material vegetal inibiu, além da migração leucocitária, a quimiotaxia de neutrófilos ativados.

Ainda, este extrato e as frações isoladas inibiram a atividade da enzima adenosina-deaminase, outra importante enzima relacionada à ativação de mononucleares. Estudos em modelos de inflamação e fibrose pulmonar demonstraram que esta enzima está diretamente associada ao processo inflamatório crônico (SUN et al., 2006).

O presente resultado demonstrou ainda que o extrato aquoso e suas frações inibiram os níveis de IL-1 β e TNF- α na inflamação induzida pela carragenina.

A interleucina-1 beta (IL-1 β) é liberada predominantemente por macrófagos (CHANG et al., 2004). Esta atua, principalmente, promovendo a quimiotaxia das células inflamatórias e apresenta um efeito inflamatório sinérgico com o TNF- α (HIETBRINK et al., 2006).

O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) é liberado principalmente por macrófagos ativados, monócitos, neutrófilos, linfócitos T e células NK (TIAN; NOWAK; BRASIER, 2005). Esta citocina, além de induzir a liberação de outras citocinas, promove a ativação do fator de transcrição nuclear- κ B (NF- κ B), que, por sua vez, induz a liberação de diferentes mediadores pró-inflamatórios (TIAN; NOWAK; BRASIER, 2005; HIRATA et al., 2007).

Estudos demonstraram que a inibição da ativação de NF- κ B inibe a liberação de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β e TNF- α no modelo experimental da colite induzido por DSS, em camundongos (HIRATA et al., 2007). Tanto o TNF- α como a IL-1 β induzem a liberação de outras citocinas pró-inflamatórias como, por exemplo, a IL-6 e a IL-8 o que determina a quimiotaxia e a apoptose de neutrófilos na resposta inflamatória aguda (HIETBRINK et al., 2006).

A quemocina KC é uma citocina da classe das quemocinas C-X-C e liga-se principalmente a receptores do tipo C-X-CR2 em neutrófilos (REUTERSHAN et al., 2006). Esta ligação promove a ativação e a quimiotaxia dos neutrófilos no sítio da resposta inflamatória. Este fato é comprovado em estudos que demonstraram que a concentração de KC está diretamente associada à quimiotaxia de neutrófilos no modelo de lesão pulmonar induzida por ligação do ceco e punção (CLP), em camundongos (LOMAS-NEIRA et al., 2005). Outros estudos demonstraram também que a quimiotaxia de neutrófilos pode ser decorrente da ativação de quemocinas da classe C-C no modelo de sepse induzida por CLP, em camundongos (SPEYER et al., 2004).

De uma forma geral, os efeitos observados no presente trabalho poderiam ser atribuídos a diferentes substâncias já isoladas das raízes desta espécie. Dentre estas substâncias destacam-se os flavonóides, os quais possuem atividade antiinflamatória comprovada (GONZÁLEZ-GALLEGOS; SÁNCHEZ-CAMPOS; TUÑÓN, 2007). Esta classe de substâncias inibe a produção e/ou liberação de mediadores, como o NO, além de inibir a expressão de proteínas como iNOS, TNF- α , COX-2 e IL-6 e a ativação de NF- κ B em modelo de sepse induzido por lipopolissacarídeo (LPS), em camundongos (KANNO et al., 2006).

Em outro estudo, Clavin et al., (2007) demonstraram o efeito antiinflamatório de flavonóides inibindo o NF- κ B no modelo experimental do edema de orelha, induzido por 12-O-tetradecanoilforbol 13-acetato (TPA), em camundongos. Ainda, o

efeito antiinflamatório dos flavonóides foi demonstrado no modelo do edema de pata induzido pela carragenina, em camundongos (KÜPELI; YESILADA, 2007).

Outras substâncias isoladas da *Solidago chilensis* foram os diterpenos e os sesquiterpenos (VILA et al., 2002). Estas substâncias também já são conhecidas por apresentarem efeitos antiinflamatórios ao inibir a ativação do NF- κ B e a migração de neutrófilos no modelo do edema de pata induzido por lipopolissacarídeo (LPS), em ratos (MEDEIROS et al., 2007).

Com relação aos diterpenos, estudos demonstraram que estes compostos inibiram a produção e/ou liberação de NO, PGE₂ e TNF- α , bem como a expressão de iNOS, COX-2 e TNF- α via inibição da ativação do NF- κ B, no modelo do edema de pata induzido pela carragenina, em ratos (PARK et al., 2007).

Ainda, outra classe de substâncias encontrada nas espécies de *Solidago*, são as saponinas. Estas substâncias demonstraram possuir ação antiinflamatória no modelo do edema de pata induzido pela carragenina, em ratos (LI; LIANG; YUAN, 2007). Em outros estudos, as saponinas demonstraram efeito antiinflamatório no modelo do edema de pata induzido pela carragenina, em ratos (CHOI et al., 2005b).

É importante ressaltar que os resultados demonstrados neste estudo, tanto para o extrato aquoso como para as frações butanólica e resíduo aquoso, das raízes de *Solidago chilensis*, foi similar ao observado nos animais tratados previamente com indometacina ou dexametasona, o que pode sugerir uma via comum de mecanismo de ação antiinflamatório.

Levando em consideração a complexidade do processo inflamatório envolvendo diferentes mediadores, é possível propor uma hipótese para o mecanismo de ação antiinflamatória do extrato e suas frações. Este material vegetal inibiu os níveis de IL-1 β , TNF- α e NO. Uma vez que estes agentes são responsáveis pela liberação de outros mediadores pró-inflamatórios, induzindo a expressão de moléculas de adesão e conseqüente quimiotaxia leucocitária, podemos supor que o mecanismo de ação é via inibição da liberação e/ou expressão de citocinas pró-inflamatórias do tipo IL-1 β , TNF- α e KC (Figura 2). Este efeito pode ainda estar relacionado à inibição do NF- κ B, responsável pela liberação destas citocinas pró-inflamatórias liberadas de células ativadas.

Outro fator importante é a presença de substâncias antiinflamatórias já isoladas desta espécie como os flavonóides, diterpenos, sesquiterpenos e

saponinas, conhecidos por possuir atividade antiinflamatória. Além disso, as diferenças de inibição em relação às frações e extrato aquoso da *Solidago chilensis* podem ser devido às diferentes concentrações destas substâncias já isoladas para esta espécie. Desta forma, os resultados obtidos confirmam o uso desta planta na medicina popular. Além disso, estes estudos apontam uma nova perspectiva na utilização da *Solidago chilensis* como fonte de novos agentes fitoterápicos, já que a arnica já é utilizada no tratamento de doenças inflamatórias na pele (Arnica® - Kley Hertz S.A.).

5. CONCLUSÕES

1. O mecanismo de ação antiinflamatória parece estar relacionado à inibição de enzimas pró-inflamatórias (MPO e ADA) e à inibição da liberação de mediadores pró-inflamatórios como o óxido nítrico (NO), as citocinas (IL-1 β e TNF- α) e a quimocina KC.
2. Tanto o extrato aquoso como as frações isoladas das raízes de *Solidago chilensis* inibiram os parâmetros avaliados de forma semelhante à indometacina e à dexametasona, o que pode demonstrar uma via comum de mecanismo de ação antiinflamatória.

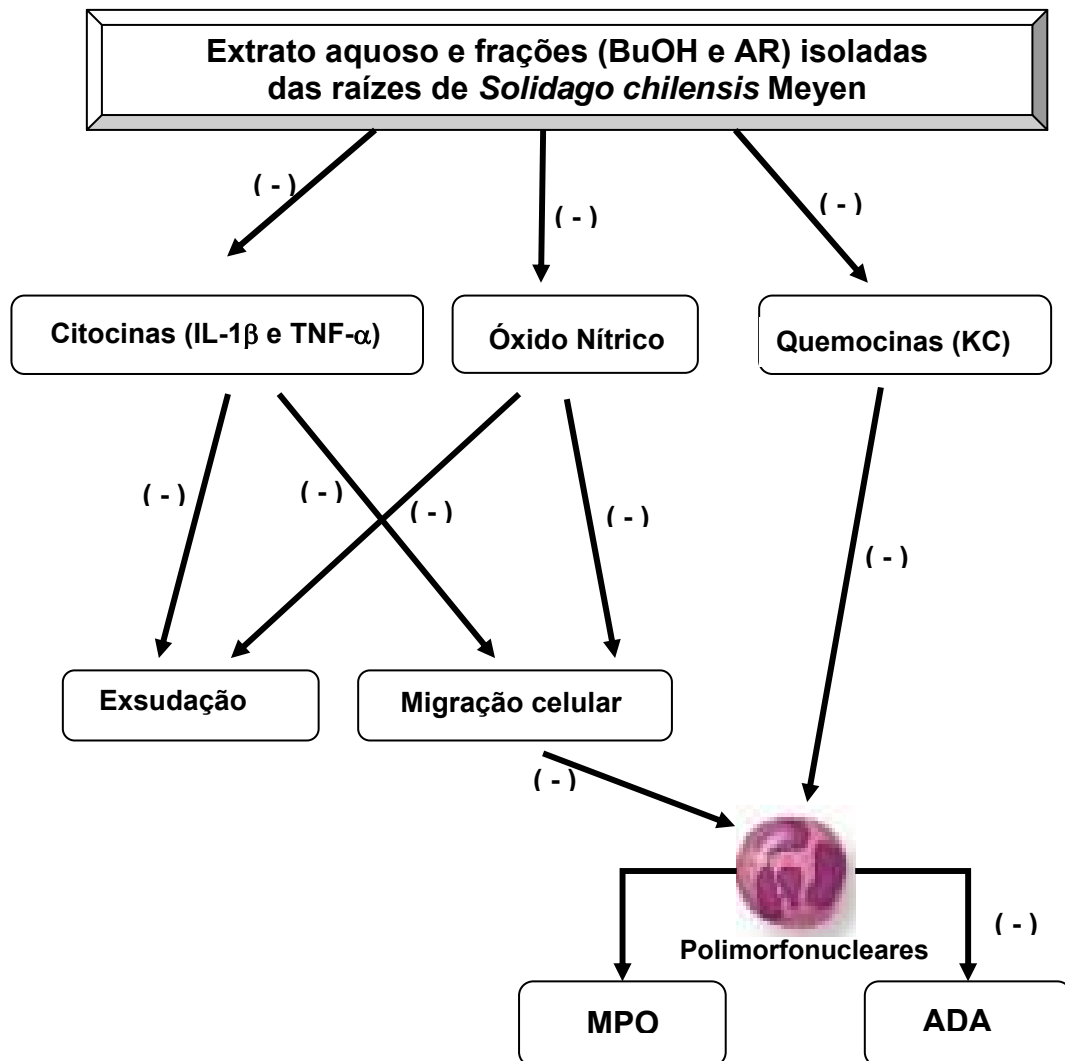


Figura 2: Mecanismo de ação antiinflamatória proposto para a *Solidago chilensis* Meyen. MPO = Mieloperoxidase; ADA = Adenosina-deaminase; IL-1 β = Interleucina-1 beta; TNF- α = fator de necrose tumoral alfa; KC = quemocina para neutrófilos; (-) = ação inibitória da *Solidago chilensis*.

6. PERSPECTIVAS

1. Obter compostos isolados das frações estudadas que tiveram efeito antiinflamatório, com o intuito de caracterizar as substâncias bioativas responsáveis por este efeito na *Solidago chilensis*.
2. Avaliar o efeito dos extratos sobre a expressão de RNAm para mediadores e citocinas pró-inflamatórias.
3. Avaliar outras atividades biológicas, como antimicrobiana e antiplaquetária da *Solidago chilensis*.

REFERÊNCIAS

- ALI, S.; LAZENNEC, G.. Chemokines: novel targets for breast cancer metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 2007, (In press).
- APÁTI, P.; HOUGHTON, P.J.; KITE, G.; STEVENTON, G.B.; KERY, A.. In-vitro effect of flavonoids from *Solidago canadensis* extract on glutathione S-transferase. *J Pharm Pharmacol.* v. 58, p. 251-256, 2006.
- ARATANI, Y.. Role of myeloperoxidase in the host defense against fungal infection. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi.* v. 47, p. 195-199, 2006.
- ARATANI, Y.; KURA, F.; WATANABE, H.; AKAGAWA, H.; TAKANO, Y.; ISHIDA-OKAWARA, A.; SUZUKI, K.; MAEDA, N.; KOYAMA, H.. Contribution of the myeloperoxidase-dependent oxidative system to host defence against *Cryptococcus neoformans*. *J. Med. Microbiol.* v. 55, p. 1291-1299, 2006.
- ARIBI, M.; MOULESSEHOUL, S.; KENDOUCI-TANI, M.; BENABADJI, A.B.; HICHAMI, A.; KHAN, N.A.. Relationship between interleukin-1beta and lipids in type 1 diabetic patients. *Med Sci Monit.* v. 13, p. 372-378, 2007.
- ARNHOLD, J.. Properties, functions, and secretion of human myeloperoxidase. *Biochemistry.* v. 69, p. 4-9, 2004.
- BENINCÁ, J.P.; MONTANHER, A.B.; ZUCOLOTTI, S.M.; SCHENKEL, E.P.; FRÖDE, T.S.. Evaluation of the anti-inflammatory efficacy of *Passiflora edulis*. *Food Chem.* v. 104, p. 1097-1105, 2007.
- BHATIA, M.; MOOCHHALA, S.. Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome. *J. Pathol.* v. 202, p. 145-156, 2005.
- BOISVERT, W.A.; ROSE, D.M.; JOHNSON, K.A.; FUENTES, M.E.; LIRA, S.A.; CURTISS, L.K.; TERKELTAUB, R.A.. Up-regulated expression of the CXCR2 ligand KC/GRO-alpha in atherosclerotic lesions plays a central role in macrophage accumulation and lesion progression. *Am. J. Pathol.* v. 171, p. 938-946, 2006.
- BRACKE, K.R.; DEMEDTS, I.K.; JOOS, G.F.; BRUSSELLE, G.G.. CC-chemokine receptors in chronic obstructive pulmonary disease. *Inflamm. Allergy Drug Targets.* v. 6, p. 75-79, 2007.
- CABRERA, A.L.. *Flora Ilustrada de Entre Rios*. Parte VI. Tomo VI, Buenos Aires: Inta, 1974.
- CHANG, D.M.; SHYUE, S.K.; LIU, S.H.; CHEN, Y.T.; YEH, C.Y.; LAI, J.H.; LEE, H.S.; CHEN, A.. Dual biological functions of an interleukin-1 receptor antagonist-interleukin-10 fusion protein and its suppressive effects on joint inflammation. *Immunology.* v. 112, p. 643-650, 2004.

CHOI, S.Z.; CHOI, S.U.; BAE, S.Y.; PYO, S.; LEE, K.R.. Immunobiological activity of a new benzyl benzoate from the aerial parts of *Solidago virgaurea* var. *gigantea*. *Arch. Pharm. Res.* v. 28, p. 49-54, 2005a.

CHOI, J.; JUNG, H.J.; LEE, K.T.; PARK, H.J.. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of the saponin and sapogenins obtained from the stem of *Akebia quinata*. *J. Med. Food.* v. 8, p. 78-85, 2005b.

CLARK, J.M.. Uptake of colloidal thorium dioxide by the mouse connective tissue mast cell. *Tex. Rep. Biol. Med.* v. 33, p. 397-406, 1975.

CLAVIN, M.; GORZALCZANY, S.; MACHO, A.; MUÑOZ, E.; FERRARO, G.; ACEVEDO, C.; MARTINO, V.. Anti-inflammatory activity of flavonoids from *Eupatorium arnottianum*. *J. Ethnopharmacol.* v. 112, p. 585-589, 2007.

COELHO, M.F.B.; SILVA, A.C.. In: "Pontes e Lacerda" and "Comodoro". *Agricultura Tropical, UFMT/FAMEV*. Mato Grosso, 1995.

CONLON, B.A.; LAW, W.R.. Macrophages are a source of extracellular adenosine deaminase-2 during inflammatory responses. *Clin. Exp. Immunol.* v. 138, p. 14-20, 2004.

DI CIOCCIO, V.; STRIPPOLI, R.; BIZZARRI, C.; TROIANI, G.; CERVELLERA, M.N.; GLOAGUEN, I.; COLAGRANDE, A.; CATTOZZO, E.M.; PAGLIEI, S.; SANTONI, A.; COLOTTA, F.; MAINIERO, F.; BERTINI, R.. Key role of proline-rich tyrosine kinase 2 in interleukin-8 (CXCL8/IL-8)-mediated human neutrophil chemotaxis. *Immunology.* v. 111, p. 407-415, 2004.

DUARTE, M.C.; FIGUEIRA, G.M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V.L.; DELARMELINA, C.. Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* v. 97, p. 305-311, 2005.

EGESTEN, A.; ELIASSON, M.; OLIN, A.I.; ERJEFÄLT, J.S.; BJARTELL, A.; SANGFELT, P.; CARLSON, M.. The proinflammatory CXC-chemokines GRO- α /CXCL1 and MIG/CXCL9 are concomitantly expressed in ulcerative colitis and decrease during treatment with topical corticosteroids. *Int. J. Colorectal Dis.* 2007. (In press).

FAN, Z.; SÖDER, S.; OEHLER, S.; FUNDEL, K.; AIGNER, T.. Activation of interleukin-1 signaling cascades in normal and osteoarthritic articular cartilage. *Am. J. Pathol.* v. 171, p. 938-946, 2007.

FARMACOPÉIA Brasileira. São Paulo, Brasil: Companhia Editora Nacional, 1929. p. 99-100.

FRÖDE, T.S.; MEDEIROS, Y.S.. Myeloperoxidase and adenosine-deaminase levels in the pleural fluid leakage induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. *Mediators Inflamm.* v. 10, p. 223-227, 2001.

GAUT, J.P.; YEH, G.C.; TRAN, H.D.; BYUN, J.; HENDERSON, J.P.; RICHTER, G.M.; BRENNAN, M.L.; LUSIS, A.J.; BELAAOUAI, A.; HOTCHKISS, R.S.;

HEINECKE, J.W.. Neutrophils employ the myeloperoxidase system to generate antimicrobial brominating and chlorinating oxidants during sepsis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* v. 98, p. 11961-1196, 2001.

GIORGETTI, M.; NEGRI, G.; RODRIGUES, E.. Brazilian plants with possible action on the central nervous system: a study of historical sources from the 16th to 19th century. *J. Ethnopharmacol.* v. 109, p. 338-347, 2007.

GIUSTI, G.; GALANTI, B.. Adenosine deaminase: colourimetric method. In: Bergmeyer, H.U. (ed) *Methods of enzymatic analyses*, 3th ed. Verlag Chemie, Weinheim: Germany, pp 315-323, 1984.

GONZÁLEZ-GALLEGO, J.; SÁNCHEZ-CAMOS, S.; TUÑÓN, M.J.. Anti-inflammatory properties of dietary flavonoids. *Nutr. Hosp.* v. 22, p. 287, 293, 2007.

GOULART, S.; MORITZ, M.I.G.; LANG, K.L.; LIZ, R.; SCHENKEL, E.P.; FRÖDE, T.S.. Anti-inflammatory evaluation of *Solidago chilensis* Meyen in a murine model of pleurisy. *J. Ethnopharmacol.* v. 113, p. 346-353, 2007.

GREEN, I.C.; WAGNER, D.A.; GLOWSKI, J.; SKIPPER, P.L.; WISHNOK, J.S.; TANNENBAUM, S.B.. Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* v. 126, p. 131-138, 1982.

GREENACRE, S.A.; ROCHA, F.A.; RAWLINGSON, A.; MEINERIKANDATHEVAN, S.; POSTON, R.N.; RUIZ, E.; HALLIWELL, B.; BRAIN, S.D.. Protein nitration in cutaneous inflammation in the rat: essential role of inducible nitric oxide synthase and polymorphonuclear leukocytes. *British J. Pharmacol.* v. 136, p. 985-994, 2002.

GROSS, S.C.; GOODARZI, G.; WATABE, M.; BANDYOPADHYAY, S.; PAI, S.K.; WATABE, K.. Antineoplastic activity of *Solidago virgaurea* on prostatic tumor cells in an SCID mouse model. *Nutr Cancer.* v. 43, p. 76-81, 2002.

GUTIERREZ, A.B.; OBERTI, J.C.; JULIANI, H.R.. Constituents of *Solidago chilensis* (Compositae). *An. Asoc. Qmic. Arg.* v. 69, p. 27-31, 1981.

HANSSON, M.; OLSSON, I.; NAUSEEF, W.M.. Biosynthesis, processing, and sorting of human myeloperoxidase. *Archs. of Biochem. and Biophys.* v. 445, p. 214-224, 2006.

HIETBRINK, F.; KOENDERMAN, L.; RIJKERS, G.; LEENEN, L.. Trauma: the role of the innate immune system. *World J Emerg Surg.* v. 20, p. 1-15, 2006.

HIRATA, I.; YASUMOTO, S.; TOSHINA, K.; INOUE, T.; NISHIKAWA, T.; MURANO, N.; MURANO, M.; WANG, F.Y.; KATSU, K.. Evaluation of the effect of pyrrolidine dithiocarbamate in suppressing inflammation in mice with dextran sodium sulfate-induced colitis. *World J. Gastroenterol.* v. 13, p. 1666-1671, 2007.

KANNO, S.; SHOUJI, A.; TOMIZAWA, A.; HIURA, T.; OSANAI, Y.; UJIBE, M.; OBARA, Y.; NAKAHATA, N.; ISHIKAWA, M.. Inhibitory effect of naringin on lipopolysaccharide (LPS)-induced endotoxin shock in mice and nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages. *Life Sci.* v. 78, p. 673-681, 2006.

KELLEHER, Z.T.; MATSUMOTO, A.; STAMLER, J.S.; MARSHALL, H.E.. NOS2 regulation of NF-kappa B by S-nitrosylation of p65* *J. Biol. Chem.* 2007. (In press).

KIM, D.W.; CHI, Y.S.; SON, K.H.; CHANG, H.W.; KIM, J.S.; KANG, S.S.; KIM, H.P.. Effects of sophoraflavanone G, a prenylated flavonoid from *Sophora flavescens*, on cyclooxygenase-2 and in vivo inflammatory response. *Arch Pharm Res.* v. 25, p. 329-335, 2002.

KLEBANOFF, S.J.. Myeloperoxidase: friend ou foe. *J. Leuk. Biol.* v. 77, p. 1-28, 2005.

KOHNO, H.; TAKAHASHI, M.; YASUI, Y.; SUZUKI, R.; MIYAMOTO, S.; KAMANAKA, Y.; NAKA, M.; MARUYAMA, T.; WAKABAYASHI, K.; TANAKA, T.. A specific inducible nitric oxide synthase inhibitor, ONO-1714 attenuates inflammation-related large bowel carcinogenesis in male Apc(Min/+) mice. *Int. J. Cancer.* v. 121, p. 506-513, 2007.

KÜPELI, E.; YESILADA, E.. Flavonoids with anti-inflammatory and antinociceptive activity from *Cistus laurifolius* L. leaves through bioassay-guided procedures. *J. Ethnopharmacol.* v. 112, p. 524-530, 2007.

LI, J.P.; LIANG, Z.M.; YUAN, Z.. Triterpenoid saponins and anti-inflammatory activity of *Codonopsis lanceolata*. *Pharmazie.* v. 62, p. 463-466, 2007.

LOMAS-NEIRA, J.L.; CHUNG, C.S.; WESCHE, D.E.; PERL, M.; AYALA, A.. In vivo gene silencing (with siRNA) of pulmonary expression of MIP-2 versus KC results in divergent effects on hemorrhage-induced, neutrophil-mediated septic acute lung injury. *J. Leukoc. Biol.* v. 77, p. 846-853, 2005.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A.. *Plantas Medicinais no Brasil - Nativas e exóticas*. Instituto Plantarum de Estudos da Flora, São Paulo, Brasil, 2002.

MALAVIYA, A.M.. Cytokine network and its manipulation in rheumatoid arthritis. *J Assoc. Physicians India.* v. 54, p. 15-18, 2006.

MANDERSCHIED, P.A.; BODKIN, R.P.; DAVIDON, B.A.; JENSEN, E.; RUSSO, T.A.; KNIGHT, P.R.. Bacterial clearance and cytokine profiles in a murine model of postsurgical nosocomial pneumonia. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* v. 11, p. 742-751, 2004.

MANTOVANI, A.; SICA, A.; LOCATI, M.. New vistas on macrophage differentiation and activation. *Eur. J. Immunol.* v. 37, p. 14-16, 2007.

MARCUS, J.S.; KARACKATTU, S.L.; FLEEGAL, M.A.; SUMNERS, C.. Cytokine-stimulated inducible nitric oxide synthase expression in astroglia: role of Erk mitogen-activated protein kinase and NF-kappaB. *Glia*. v. 41, p. 152-60, 2003.

MARIOTTO, S.; SUZUKI, Y.; PERSICHINI, T.; COLASANTI, M.; SUZUKI, H.; CANTONI, O.. Cross-talk between NO and arachidonic acid in inflammation. *Curr. Med. Chem.* v. 14, p. 1940-1944, 2007.

MCCUNE, L.M., JOHNS, T.. Antioxidant activity in medicinal plants associated with the symptoms of diabetes mellitus used by the indigenous peoples of the North American boreal forest. *J. Ethnopharmacol.* v. 82, p. 197-205, 2002.

MEDEIROS, R.; PASSOS, G.F.; VITOR, C.E.; KOEPP, J.; MAZZUCO, T.L.; PIANOWSKI, L.F.; CAMPOS, M.M.; CALIXTO, J.B.. Effect of two active compounds obtained from the essential oil of *Cordia verbenacea* on the acute inflammatory responses elicited by LPS in the rat paw. *Br. J. Pharmacol.* v. 151, p. 618-627, 2007.

MELZIG, M. F.. Goldenrod - a classical exponent in the urological phytotherapy. *Wien Med Wochenschr.* v. 154, p. 523-527, 2004.

METZNER, J.; HIRSCHELMANN, R.; HILLER, K.. Antiphlogistic and analgesic effects of leiocarposide, a phenolic bisglucoside from *Solidago virgaurea* L.. *Pharmazie* v. 39, p. 869-870, 1984.

MONTAG, C.; WAGNER, J.; GRUSKA, I.; HAGEMEIERS, C.. Human cytomegalovirus blocks tumor necrosis factor alpha- and interleukin-1beta-mediated NF-kappaB signaling. *J. Virol.* v. 80, p. 11686-11698, 2006.

MONTANHER, A.B.; ZUCOLOTO, S.M.; SCHENKEL, E.P.; FRÖDE, T.S.. Evidence of anti-inflammatory effects of *Passiflora edulis* in an inflammation model. *J. Ethnopharmacol.* v. 109, p. 281-288, 2007.

MOREL, A.F.; DIAS, G.O.; PORTO, C.; SIMIONATTO, E.; STUKER, C.Z.; DALCOL, I.I.. Antimicrobial activity of extractives of *Solidago microglossa*. *Fitoterapia*. v. 77, p. 453-455, 2006.

MORIKAWA, K.; NONAKA, M.; NARAHARA, M.; TORII, I.; KAWAGUCHI, K.; YOSHIKAWA, T.; KUMAZAWA, Y.; MORIKAWA, S.. Inhibitory effect of quercetin on carrageenan-induced inflammation in rats *Life Sci.* v. 74, p. 709-721, 2003.

MORS, W.B.; RIZZINI, C.T.; PEREIRA, N.A.. *Medicinal plants of Brazil*. Algonac, Reference Publications, 2000.

NATHAN, C.. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat. Rev. Immunol.* v. 6, p. 173-182, 2006.

OKAMOTO, T.; GOHIL, K.; FINKELSTEIN, E.I.; BOVE, P.; AKAIKE, T.; VAN DER VLIET, A.. Multiple contributing roles for NOS2 in LPS-induced acute airway inflammation in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. v. 286, p. 198-209, 2004.

OKUDAIRA, M.; SCHWARZ, J.. *Histoplasma capsulatum* infection in rat air pouch. *Archs. Pathol*. v. 74, p. 239-243, 1962.

PARK, H.J.; KIM, I.T.; WON, J.H.; JEONG, S.H.; PARK, E.Y.; NAM, J.H.; CHOI, J.; LEE, K.T.. Anti-inflammatory activities of ent-16 α H,17-hydroxy-kauran-19-oic acid isolated from the roots of *Siegesbeckia pubescens* are due to the inhibition of iNOS and COX-2 expression in RAW 264.7 macrophages via NF-kappaB inactivation. *Eur. J. Pharmacol*. v. 558, p. 185-193, 2007.

RAO, T.S.; CURIE, J.L.; SHAFFER, A.F.; ISAKSON, P.C.. Comparative evaluation of arachidonic acid (AA)-and tetradecanoylphorbol acetate (TPA)-induced dermal inflammation. *Inflammation* v. 17, p. 723-741, 1993.

RATES, S.M.. Plants as source of drugs. *Toxicon*. v. 39, p. 603-613, 2001.

REUTERSHAN, J.; MORRIS, M.A.; BURCIN, T.L.; SMITH, D.F.; CHANG, D.; SAPRITO, M.S.; LEY, K.. Critical role of endothelial CXCR2 in LPS-induced neutrophil migration into the lung. *J. Clin. Invest*. v. 116, p. 695-702, 2006.

RUTH, J.H.; AMIN, M.A.; WOOD, J.M.; HE, X.; SAMUEL, S.; YI, N.; HAAS, C.S.; KOCH, A.E.; BULLARD, D.C.. Accelerated development of Arthritis in mice lacking endothelial selectins. *Arthritis Res. Therap*. v. 7, p. 957-970, 2005.

SALEH, T.S.F.; CALIXTO, J.B.; MEDEIROS, Y.S.. Anti-inflammatory effects of theophylline, cromolyn and salbutamol in a murine model of pleurisy. *Br. J. Pharmacol*. v. 118, p. 811-819, 1996.

SALEH, T.S.F.; CALIXTO, J.B.; MEDEIROS, Y.S.. Effects of anti-inflammatory drugs upon nitrate and myeloperoxidase levels in the mouse pleurisy induced by carrageenan. *Peptides*. v. 20, p. 949-956, 1999.

SAMPSON, J.H.; PHILLIPSON, J.D.; BOWERY, N.G.; O'NEILL, M.J.; HOUSTON, J.G.; LEWIS, J.A.. Ethnomedicinally selected plants as sources of potential analgesic compounds: indication of in vitro biological activity in receptor binding assays. *Phytother Res*. v. 14, p. 24-29, 2000.

SANCHAYITA, M.; ABRAHAM, E.. Participation of superoxide in neutrophil activation and cytokine production. *Biochim. Biophys. Acta*. v. 1762, p. 732-741, 2006.

SANCHEZ DE MEDINA, F.; VERA, B.; GALVEZ, J.; ZARZUELO, A.. Effect of quercitrin on the early stages of hapten induced colonic inflammation in the rat. *Life Sci*. v. 70, p. 3097-3108, 2002.

SAYYAH, M.; HADIDI, N.; KAMALINEJAD, M.. Analgesic and anti-inflammatory activity of *Lactuca sativa* seed extract in rats. *J. Ethnopharmacol.* v. 92, p. 325-329, 2004.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.. A labdan diterpene from *Solidago chilensis* Roots. *Planta Medica*, v. 2, p. 179-180, 1987.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; RODRIGUEZ, J.; ASTUDILLO, L.. Gastroprotective activity of the diterpene solidagenone and its derivatives on experimentally induced gastric lesions in mice. *J. of Ethnopharmacol.*, v. 81, p. 111-115, 2002.

SCHMID-SCHÖNBEIN, G.W.. Analysis of Inflammation. *Annual Review of Biomed. Eng.* v. 8, p. 93-151, 2006.

SEDGWICK, A.D.; WILLOUGHBY, D.A.. In: HANDBOOK OF INFLAMMATION. *Initiation of inflammatory response and its prevention*. New York, 1985. p. 27-47.

SEDGWICK, A.D.; LEES, P.. Studies of eicosanoid production in the air pouch model of synovial inflammation. *Agents Actions*. v. 18, p. 429-438, 1986.

SEELY, A.J.E.; PASCUAL, J.L.; CRISTOU, N.V.. Science review: Cell membrane expression (connectivity) regulates neutrophil delivery, function and clearance. *Critical Care*. v. 7, p. 291-307, 2003.

SHEN, S.C.; LEE, W.R.; LIN, H.Y.; HUANG, H.C.; KO, C.H.; YANG, L.L.; CHEN, Y.C.. *In vitro* and *in vivo* inhibitory activities of rutin, wogonin, or quercetin on lipopolysaccharide-induced nitric oxide and prostaglandin E(2) production. *Eur. J. of Pharmacol.* v. 446, p. 187-194, 2002.

SMITH, J.A.. Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword. *J. Leuk. Biol.* v. 56, p. 672-686, 1994.

SPEYER, C.L.; GAO, H.; RANCILIO, N.J.; NEFF, T.A.; HUFFNAGLE, G.B.; SARMA, J.V.; WARD, P.A.. Novel Chemokine Responsiveness and Mobilization of Neutrophils during Sepsis. *Am. J. Pathol.* v. 165, p. 2187-2196, 2004.

SPICUZZA, L.; DI MARIA, G.; POLOSA, R.. Adenosine in the airways: implications and applications. *European J. Pharmacol.* v. 533, p. 77-86, 2006.

SUN, C.X.; ZHONG, H.; MOHSENIN, A.; MORSCHL, E.; CHUNN, J.L.; MOLINA, J.G.; BELARDINELLI, L.; ZENG, D.; BLACKBURN, M.R.. Role of A2B adenosine receptor signaling in adenosine-dependent pulmonary inflammation and injury. *J. Clin. Invest.* v. 116, p. 2173-2182, 2006.

SUNG, C.S.; WONG, C.S.. Cellular mechanisms of neuroinflammatory pain: the role of interleukin-1beta. *Acta. Anaesthesiol. Taiwan.* v. 45, p. 103-109, 2007.

TAKEUCHI, K.; WATANABE, H.; TRAN, Q.K.; OZEKI, M.; SUMI, D.; HAYASHI, T.; IGUCHI, A.; IGNARRO, L.J.; OHASHI, K.; HAYASHI, H.. Nitric oxide: inhibitory effects on endothelial cell calcium signaling, prostaglandin I2 production and nitric

oxide synthase expression. *Cardiovasc. Res.* v. 62, p. 194-201, 2004.

TIAN, B.; NOWAK, D.E.; BRASIER, A.R.. A TNF-induced gene expression program under oscillatory NF- κ B control. *BMC Genomics.* v. 6, p. 137, 2005.

TOBIN, A.M.; KIRBY, B.. TNF alpha inhibitors in the treatment of psoriasis and psoriatic arthritis. *Biodrugs.* v. 19, p. 47-57, 2005.

TORRES, L.M.B.; AKISUE, M.K.; ROQUE, N.F.. Quercitrina em *Solidago microglossa* DC, a arnica do Brasil. *Revista de Farmácia e Bioquímica - USP*, v. 23, p. 33-40, 1987.

TOUSSIROT, E.; WENDLING, D.. The use of TNF-alpha blocking agents in rheumatoid arthritis: an update. *Expert. Opin. Pharmacother.* v. 8, p. 2089-2107, 2007.

TSUCHIYA, K.; SAKAI, H.; SUZUKI, N.; IWASHIMA, F.; YOSHIMOTO, T.; SHICHIRI, M.; HIRATA, Y.. Chronic blockade of nitric oxide synthesis reduces adiposity and improves insulin resistance in high-fat-induced obese mice. *Endocrinology.* 2007. (In press).

UNO, S.; IMAGAWA, A.; OKITA, K.; SAYAMA, K.; MORIWAKI, M.; IWAHASHI, H.; YAMAGATA, K.; TAMURA, S.; MATSUZAWA, Y.; HANAFUSA, T.; MIYAGAWA, J.; SHIMOMURA, I.. Macrophages and dendritic cells infiltrating islets with or without beta cells produces tumour necrosis factor-alpha in patients with recent-onset type 1 diabetes. *Diabetologia.* v. 50, p. 596-601, 2007.

VANNONI, D.; BERNINI, A.; CARLUCCI, F.; CIVITELLI, S.; DI PIETRO, M.C.; LEONCINI, R.; ROSI, F.; TABUCCHI, A.; TANZINI, G.; MARINELLO, E.. Enzyme activities controlling adenosine levels in normal and neoplastic tissues. *Med. Oncol.* v. 21, p. 187-195, 2004.

VILA, R.; MUNDINA, M.; TOMI, F.; FURLÁN, R.; ZACCHINO, S.; CASANOVA, J.; CAÑIGUERAR, S.. Composition and antifungal activity of the essential oil of *Solidago chilensis*. *Planta. Med.* v. 68, p. 164-167, 2002.

WILSON, H.M.; CHETTIBI, S.; JOBIN, C.; WALBAUM, D.; REES, A.J.; KLUTH, D.C.. Inhibition of macrophage nuclear factor-kappaB leads to a dominant anti-inflammatory phenotype that attenuates glomerular inflammation *in vivo*. *Am. J. Pathol.* v. 167, p. 27-37, 2005.

WINTERBOURN, C.C.; HAMPTON, M.B.; LIVESEY, J.H.; KETTLE, A.J.. Modeling the reactions of superoxide and myeloperoxidase in the neutrophil phagosome: implications for microbial killing. *J. Biol. Chem.* v. 281, p. 39860-39869, 2006.

ZAVIALOV, A.V.; ENGSTRÖM, A.. Human ADA2 belongs to a new family of growth factors with adenosine deaminase activity. *Biochem. J.* v. 391, p. 51-57, 2005.

ZHANG, L.; PEPPEL, K.; SIVASHANMUGAM, P.; ORMAN, E.S.; BRIAN, L.; EXUM, S.T.; FREEDMAN, N.J.. Expression of tumor necrosis factor receptor-1 in arterial wall

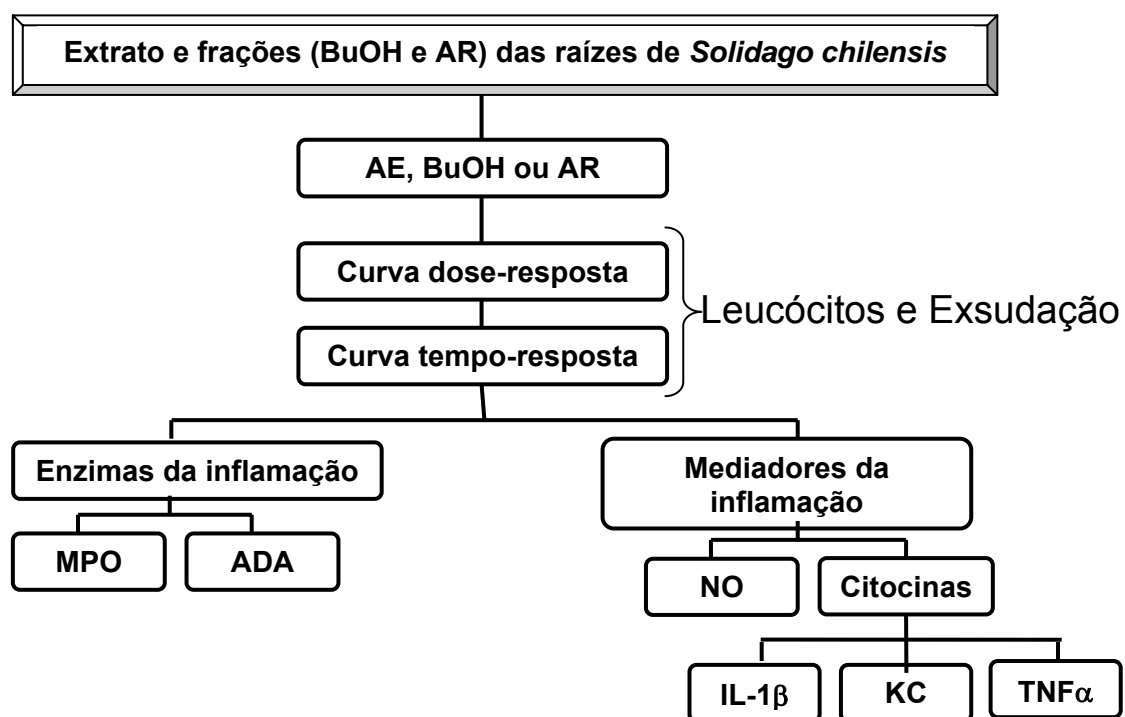
cells promotes atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* v. 27, p. 1087-1094, 2007a.

ZHANG, D.; ZHENG, H.; ZHOU, Y.; TANG, X.; YU, B.; LI, J.. Association of IL-1beta gene polymorphism with cachexia from locally advanced gastric cancer. *BMC. Cancer.* v. 7, p. 45, 2007b.

ZOU, W.; HU, T.H.. Effect of chemokine interleukin-8, monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage inflammatory protein-1 on the angiogenesis of non-small cell lung cancer. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* v. 32, p. 665-670, 2007.

ANEXO 1

**Protocolo do estudo do mecanismo de ação antiinflamatória do extrato aquoso
e das frações isoladas de *Solidago chilensis* Meyen**



Anexo 1 - Protocolo do estudo do mecanismo de ação antiinflamatória do extrato aquoso (AE) e das frações isoladas (BuOH e AR) da *Solidago chilensis* Meyen.

ANEXO 2**Protocolo e cadastro da Comissão de Ética no Uso de Animais**

